



UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

*Caractérisation de B3, une séquence de l'ARN pré-messager de
Bcl-x modulant l'épissage alternatif*

Par Philippe CLOUTIER
Département de microbiologie et d'infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie

15 décembre 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-31373-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-31373-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

Table des matières	I
Liste des illustrations	IV
Liste des abréviations	V
Résumé	VII
Introduction	1
<i>Introns et exons</i>	1
<i>L'épissage constitutif</i>	2
<i>L'épissage alternatif</i>	6
<i>Régulation de l'épissage alternatif</i>	8
<i>Le facteur d'épissage SRp30c</i>	11
<i>Épissage alternatif et apoptose</i>	16
<i>Rôle de Bcl-x et autres membres de la famille Bcl-2 dans l'apoptose</i>	18
<i>Épissage alternatif de Bcl-x</i>	20
Matériel et méthodes	28
<i>Clonage</i>	28
<i>Transfection</i>	30
<i>Extraction d'ARN</i>	31
<i>Transcription in vitro</i>	32
<i>Épissage in vitro</i>	34
<i>RT-PCR</i>	34
<i>Gel de retardement</i>	35

<i>Immunobuvardage de type Western</i>	36
<i>Pontage aux ultra-violets</i>	37
<i>Chromatographie d'affinité à l'ARN</i>	38
<i>Séquence des oligonucléotides</i>	39
Résultats.....	42
<i>A) L'activité enhancer de l'élément B3 est localisée dans deux sous-régions : AM2 et ML2</i>	42
<i>B) Découverte d'un silencer et d'un élément impliqué dans la liaison de la protéine SRp30c</i>	45
<i>C) Les protéines recombinantes GST-SRp30c et His-SRp30c lient les éléments AM2 et ML2</i>	48
<i>D) SRp30c endogène lie B3</i>	50
<i>E) His-SRp30c favorise l'épissage in vitro au site d'épissage 5' de Bcl-x_L</i>	52
<i>F) L'insertion de l'élément B3 en amont du site d'épissage 5' de Bcl-x_S favorise son utilisation</i>	55
<i>G) La surexpression transitoire de His-SRp30c favorise l'épissage au site 5' de Bcl-x_L</i>	56
<i>H) La surexpression stable de SRp30c renforce le site d'épissage 5' de Bcl-x_L</i> .	58
<i>I) L'interférence à ARN contre SRp30c n'affecte pas l'épissage alternatif de Bcl-x</i>	60
<i>J) La région midAM contient deux sites d'épissage 5' cryptiques</i>	62
<i>K) Un site d'épissage 5' de bcl-x_M plus fort ne compétitionne pas avec l'usage du site 5' de bcl-x_L</i>	65

Discussion.....	68
<i>SRp30c module l'activité de l'élément B3</i>	69
<i>L'élément B3 possède également un silencer et deux nouveaux sites d'épissage cryptiques</i>	74
Remerciements	77
Références	78

Liste des illustrations

Figure 1.....	3
Figure 2.....	6
Figure 3.....	7
Figure 4.....	9
Figure 5.....	13
Figure 6.....	22
Figure 7.....	25
Figure 8.....	43
Figure 9.....	46
Figure 10.....	49
Figure 11.....	51
Figure 12.....	53
Figure 13.....	55
Figure 14.....	57
Figure 15.....	59
Figure 16.....	61
Figure 17.....	63
Figure 18.....	66
Figure 19.....	70
Tableau1	29

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Bcl	«B cell lymphoma»
BH	Bcl-2 homology
CRCE	«Ceramide responsive RNA <i>cis</i> -element»
DMEM	«Dulbecco's modified Eagle's medium»
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Éthylènediaminetétracétate
ESE	«Exonic splicing enhancer»
FBS	«Fetal bovine serum»
GST	Glutathione-S-transférase
His	Histidine
hnRNP	«Heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein»
NE	«Nuclear extract»
NMD	«Nonsense mediated decay»
Oligo	Oligonucléotide
ORF	«Open reading frame»
PBS	«Phosphate-buffered saline»
PCR	«Polymerase Chain Reaction»

PMSF	Phenylmethanolsulfonyl fluoride
PNK	Polynucleotide kinase
PTP	«Permeability transition pore»
PVA	Polyacétate de vinyl
PAGE	«Polyacrylamide gel electrophoresis»
RNAi	«RNA interference»
RRM	«RNA recognition motif»
RS	Arginine-Sérine
RT	«Reverse Transcription»
SDS	Sodium dodécyl sulfate
siRNA	«Small interfering RNA»
SNB	«Sam68 nuclear body»
snRNA	«small nuclear RNA»
snRNP	«small nuclear Ribonucleoprotein»
SR	Sérine-Arginine
STAR	«Signal transduction and activation of RNA»
TBST	«Tris-Buffered Saline Tween-20»
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
Tris	Tris (hydroxyméthyl)-amino méthane
VDAC	«Voltage-dependant anion-selective channel»

Résumé

Bcl-x est un gène impliqué dans le processus de mort programmée de la cellule (apoptose) dont l'ARN pré-messager est épissé de façon alternative pour générer des isoformes ayant des activités opposées. Ainsi, les deux isoformes principaux *Bcl-x_L* et *Bcl-x_S* ont respectivement des activités anti- et pro-apoptotiques et sont produits à partir de deux sites d'épissage 5' en compétition. Un élément de 86 nucléotides nommé B3 est situé entre ces deux sites d'épissage et favorise la production de *Bcl-x_L*. La dissection de B3 par mutagenèse dirigée a permis de cerner deux éléments distincts, AM2 et ML2 agissant comme enhancer pour le site d'épissage 5' de *Bcl-x_L*. SRp30c, une protéine liant l'ARN connue pour son implication dans un nombre d'événements d'épissage alternatif, a été identifiée pour sa capacité à lier spécifiquement les éléments AM2 et ML2 par gel de retardement et pontage aux ultraviolets. L'implication de SRp30c dans le fonctionnement de l'élément B3 est soutenue par sa capacité à affecter l'épissage d'un minigène de *Bcl-x* suite à sa surexpression *in vivo* et à son ajout dans une réaction d'épissage *in vitro*. Un élément silencer, midAM, a également été identifié dans B3. On y a découvert deux sites d'épissage 5' cryptiques, *x_{M1}* et *x_{M2}* qui peuvent être utilisés, suite à l'inactivation du site d'épissage 5' authentique de *Bcl-x_L* ou à la délétion combinée des enhancers AM2 et ML2, pour former de nouveaux isoformes de *Bcl-x*.

Introduction

Introns et exons

La plupart des gènes des eucaryotes supérieurs sont constitués d'exons interrompus par les introns. Suite à leur transcription par l'ARN polymérase II, les introns sont excisés de l'ARN messager par un processus connu sous le nom d'épissage. La découverte de ces introns en 1977 par Phillip A. Sharp et, indépendamment, par Richard J. Roberts a amené beaucoup de conjectures sur l'origine et l'évolution des gènes. La théorie «*intron-early*» veut que la structure des gènes eucaryotes refléterait celle des gènes primordiaux où les exons correspondraient en fait à des «mini-gènes» dont l'assemblage et le réarrangement aurait facilité au processus de création du gène moderne, un processus perdu chez les procaryotes (DARNELL, 1978; DOOLITTLE, 1978).

Chez les eucaryotes, les introns des ARN pré-messagers nucléaires sont épissés par un énorme complexe ribonucléoprotéique, le spliceosome, composé de 5 ARN non-codants, les snRNA, et d'environ 200 protéines (JURICA et MOORE, 2003). Par ailleurs, les introns de groupe II, retrouvés chez certains procaryotes et organelles, sont épissés de façon autocatalytique, c'est-à-dire médié par l'ARN lui-même (KRUGER *et al.*, 1982). Le mécanisme chimique par lequel ces introns sont épissés ressemble étrangement au processus d'épissage des introns dits spliceosomaux. Le spliceosome pourrait donc avoir évolué d'une forme fragmentée d'un intron de classe II (SHARP, 1991).

Mais comment les introns de groupe II se seraient-ils retrouvés dans le génome des premiers eucaryotes ? On retrouve souvent dans la séquence d'un intron de groupe II des cadres de lecture ouverts permettant la traduction de protéines qui facilitent la réaction d'épissage (maturase) ou qui entraînent la mobilité de l'intron (endonucléases et rétrotranscriptases). Certains proposent que ces éléments transposables auraient envahi le génome des premiers eucaryotes à partir d'endosymbiotes primitifs (ancêtres des mitochondries et chloroplastes) avant l'apparition de l'enveloppe nucléaire (CAVALIER-SMITH, 1991; MARTIN et KOONIN, 2006).

Cependant, l'étude de la conservation des introns entre eucaryotes phylogénétiquement éloignés révèle une réalité beaucoup plus complexe, où plusieurs événements de gain et de perte d'introns par divers mécanismes se sont succédés, laissant la question de l'origine des introns beaucoup plus difficile à répondre (ROY et GILBERT, 2006).

L'épissage constitutif

Indépendamment de leur provenance, la plupart des introns eucaryotes sont épissés par un mécanisme commun (figure 1). L'assemblage du spliceosome débute par la reconnaissance de quatre éléments importants, notamment, le site d'épissage 5' (dont la séquence consensus est «^A/CAG|GUAAGU» où «|» représente la frontière entre exon et intron), le point de branchement (une adénosine dans le contexte «YNCURAY» où «Y»

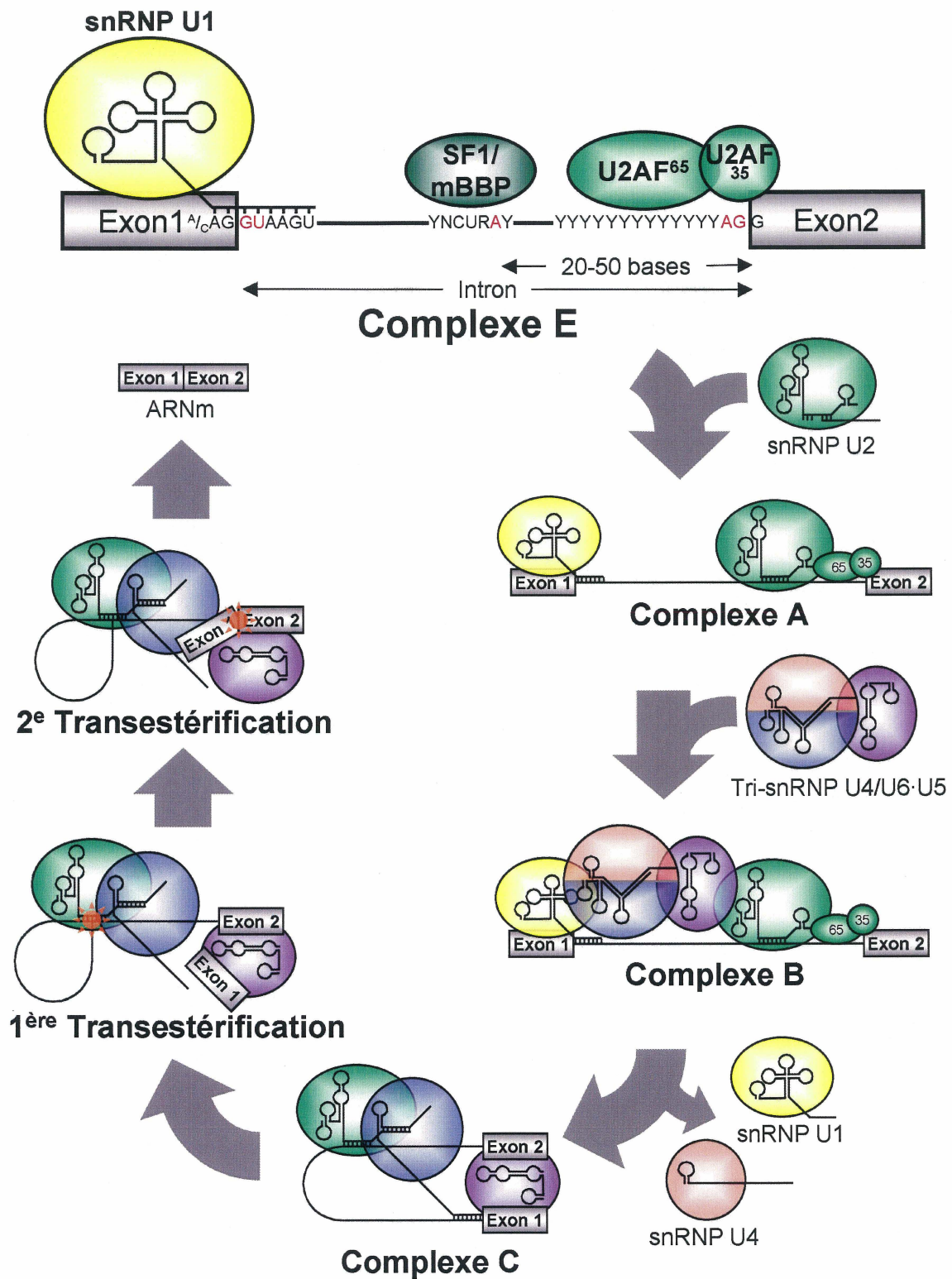


Figure 1 : Processus d'épissage d'un intron spliceosomal.

représente les pyrimidine U ou C ; «R» représente les purines A ou G et «N» représente n'importe lequel des quatre nucléotides), une série de pyrimidines suivie directement du site d'épissage 3' (consensus «Y_(n)AG|G»). Ces éléments sont reconnus respectivement par le snRNP U1 et les protéines SF1/mBBP, U2AF₆₅ et U2AF₃₅, formant ainsi la première étape du processus d'épissage, le complexe E («early») (ABOVICH et ROSBASH, 1997; BENNETT *et al.*, 1992; MERENDINO *et al.*, 1999; MICHAUD et REED, 1991; RUSKIN *et al.*, 1988; WU *et al.*, 1999; ZAMORE et GREEN, 1989; ZORIO et BLUMENTHAL, 1999). On assiste ensuite à l'arrivée du snRNP U2 au point de branchement qui déplace SF1/mBBP et s'associe à l'hétérodimère U2AF (complexe A (BENNETT *et al.*, 1992)), suivi du tri-snRNP U4/U6.U5 (complexe B (CHIARA *et al.*, 1997)). L'association de ce dernier engendre alors un profond réarrangement de la structure spliceosomale où U6 remplace U1 au site 5' (KANDELS-LEWIS et SERAPHIN, 1993) et délaisse U4 pour interagir plutôt avec U2 (MADHANI et GUTHRIE, 1992; SUN et MANLEY, 1995). De plus, U5 semble rapprocher les deux exons (SONTHEIMER et STEITZ, 1993; TEIGELKAMP *et al.*, 1995). Ce dernier complexe, nommé «C», est catalytiquement actif et procédera à deux réactions de transestérification, la première permettant la liaison du premier nucléotide de l'intron avec le groupement 2'-OH de l'adénosine critique au site de branchement. La seconde implique le dernier nucléotide du premier exon et le premier nucléotide du second, assurant la liaison des deux exons et le relâchement de l'intron sous la forme d'une molécule en lasso.

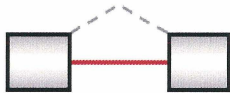
On retrouve chez les métazoaires un second type d'introns spliceosomaux dits «AT-AC» pour la nature inhabituelle de leurs extrémités («|AUAUCCUU» est le consensus du site d'épissage 5' et «YCCAC|» celui du site d'épissage 3'). La prévalence de ces introns chez les vertébrés est estimée aux environs de 0,15 à 0,34% (BURGE *et al.*, 1998; LEVINE et DURBIN, 2001). Le complexe effectuant l'épissage des introns AT-AC est similaire en structure mais diffère en composition avec le spliceosome standard. En effet, bien que ceux-ci ont en commun le snRNP U5, le spliceosome AT-AC est composé des snRNP U11 et U12, impliqués dans la reconnaissance des sites d'épissage 5' et 3', respectivement, ainsi que des snRNP U4_{atac} et U6_{atac} (TARN et STEITZ, 1997). Ce système d'épissage est souvent impliqué dans des événements d'épissage alternatif, notamment dans le cas d'exons mutuellement exclusifs où la présence de sites d'épissage incompatibles aux frontières d'un même intron limite le nombre d'isoformes possibles (SMITH, 2005).

Les éléments de séquence impliqués directement dans l'épissage sont relativement courts et souvent dégénérés. En théorie, on retrouve beaucoup plus de sites potentiels d'épissage qu'il y en a en réalité. La sélection des sites d'épissage authentiques se fait souvent avec l'aide de séquences auxiliaires qui stimuleront l'épissage (on parle alors d'enhancer). Par opposition, la répression des sites potentiels fait appel à des séquences silencer qui, par la formation d'une structure secondaire ou la liaison de protéines, inhiberont l'épissage. Historiquement, l'activité des enhancers a été liée aux protéines SR (GRAVELEY, 2000), alors que les silencers dépendaient des protéines hnRNP (CHEN *et al.*, 1999; DEL GATTO-KONCZAK *et al.*, 1999), mais on recense de plus en plus de cas

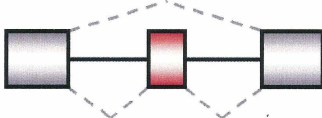
où le contraire est observé (CAPUTI et ZAHLER, 2002; CHOU *et al.*, 1999; GARNEAU *et al.*, 2005; KANOPKA *et al.*, 1996; MIN *et al.*, 1995; SHIN et MANLEY, 2002; SIMARD et CHABOT, 2002). Malgré les mécanismes permettant de faciliter la reconnaissance des sites authentiques, l'épissage fait souvent appel à l'utilisation de sites d'épissage alternatifs, provoquant ainsi la formation d'une variété d'ARNm ayant chacun des séquences différentes malgré le fait qu'ils sont tous issus du même gène. Ce phénomène est connu sous le nom d'épissage alternatif.

L'épissage alternatif

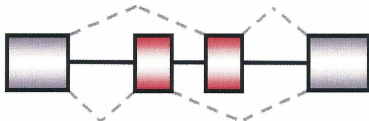
Rétention d'intron



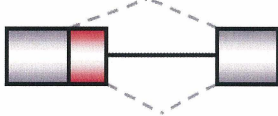
Exon alternatif (cassette)



Exons mutuellement exclusifs



Sites 5' en compétition



Sites 3' en compétition

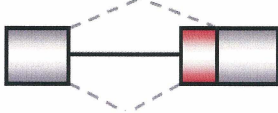


Figure 2 : Différents types d'épissage alternatif.

L'épissage alternatif peut prendre plusieurs formes (figure 2). L'exemple le plus simple s'agit de la rétention d'intron où une région de l'ARN pré-messager peut être soit épissée, soit maintenue dans l'ARNm mature. Similairement, un exon peut être exclu de l'ARNm. L'exon en question est alors attribué le nom d'exon alternatif ou exon cassette. Les exons mutuellement exclusifs sont une variante de ce phénomène et impliquent que, parmi un groupe d'exons alternatifs, un seul sera sélectionné pour faire partie de l'ARNm. Aussi, dans l'éventualité où plusieurs sites d'épissage 3' ou 5' fonctionnels se côtoient, ceux-ci peuvent entrer en compétition pour générer des exons aux limites variables.

L'avantage le plus évident d'épisser de façon variée ses ARNm est sans contredit la diversification du répertoire protéique. En effet, vu le nombre relativement restreint de gènes présents dans le génome humain (évalué à 30 000 alors que des estimations ultérieures au séquençage du génome humain oscillaient entre 80 000 et 140 000), il n'est pas surprenant d'apprendre qu'environ 74% de ceux-ci soient sujets à l'épissage alternatif (JOHNSON *et al.*, 2003).

L'exemple classique de diversité engendrée par épissage alternatif est *Dscam* chez *Drosophila* (figure 3). Ce gène contient quatre regroupements de 12, 48, 33 et 2 exons mutuellement exclusifs générant un répertoire théorique de 38 016 isoformes. L'impressionnante diversité ainsi obtenue est d'une importance cruciale puisque les isoformes de *Dscam* produits guident les axones dans la formation correcte d'une variété de synapses durant le développement du système nerveux de *Drosophila* (SCHMUCKER *et al.*, 2000).

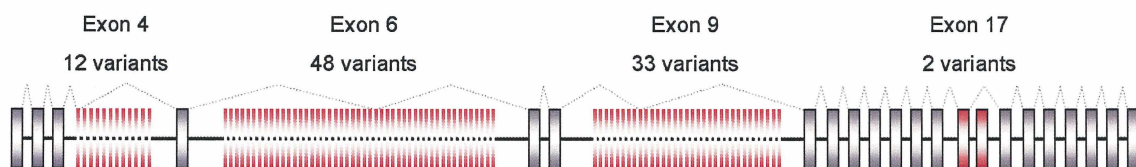


Figure 3 : Épissage alternatif de *Dscam*. Les exons alternatif sont en rouge, les exons constitutifs en gris.

L'épissage alternatif se veut aussi un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. À cet effet, Il a été démontré que l'épissage alternatif peut produire des ARNm portant des codons d'arrêt de traduction supplémentaires pouvant mener à la dégradation par NMD («*non-sense mediated decay*») (GREEN *et al.*, 2003; HILLMAN *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 2003). Ce sentier de

dégradation de l'ARN agit par la reconnaissance de codons d'arrêt situés à plus de 50 nucléotides en amont de la dernière jonction d'exons (HOLBROOK *et al.*, 2004) prévenant ainsi la synthèse de protéines non-fonctionnelles ou potentiellement néfastes issues de mutations génétiques, d'épissage aberrant, mais aussi d'épissage alternatif délibéré de certains ARNm.

Régulation de l'épissage alternatif

Vu les implications importantes sur l'expression des gènes et la diversité protéique, il n'est pas surprenant de constater que l'épissage alternatif est un phénomène fortement régulé. Un des exemples les mieux caractérisés de régulation de l'épissage alternatif a lieu également chez *Drosophila* et implique cette fois le processus de différenciation sexuelle (figure 4). Un gène, *Sxl* («*Sex-lethal*»), est à lui seul responsable de toute une cascade d'événements qui détermineront le sexe de l'embryon. Le produit de ce gène, une protéine liant l'ARN exprimée exclusivement chez la femelle, est capable d'affecter l'épissage alternatif de son propre ARN pré-messager, assurant l'obtention d'une protéine fonctionnelle. Chez le mâle cependant, où la protéine SXL est absente, on assiste à l'inclusion d'un exon supplémentaire dans l'ARNm contenant un codon d'arrêt menant à un produit non-fonctionnel (BELL *et al.*, 1988). La régulation de l'expression de ce gène est critique et repose sur la présence de deux promoteurs dont un, le promoteur précoce (P_E) n'est employé que très tôt dans le développement embryonnaire des femelles pour produire une première vague de protéines qui viendront inhiber l'inclusion de l'exon alternatif dans les ARN pré-messager suivants transcrits à partir du promoteur tardif (P_L)

(KEYES *et al.*, 1992). Le champ d'action de SXL, dont l'activité repose essentiellement sur l'inhibition directe de la liaison du complexe U2AF au site d'épissage 3', ne se limite pas à son propre ARN pré-messager, mais affecte également l'épissage de *Msl-2* («*Male-specific lethal 2*») (BASHAW et BAKER, 1995) et *Tra* («*Transformer*») (BELOTE *et al.*, 1989), des protéines impliquées dans le dosage génétique compensatoire et l'épissage alternatif, respectivement. La protéine TRA, seulement fonctionnelle chez la femelle, est

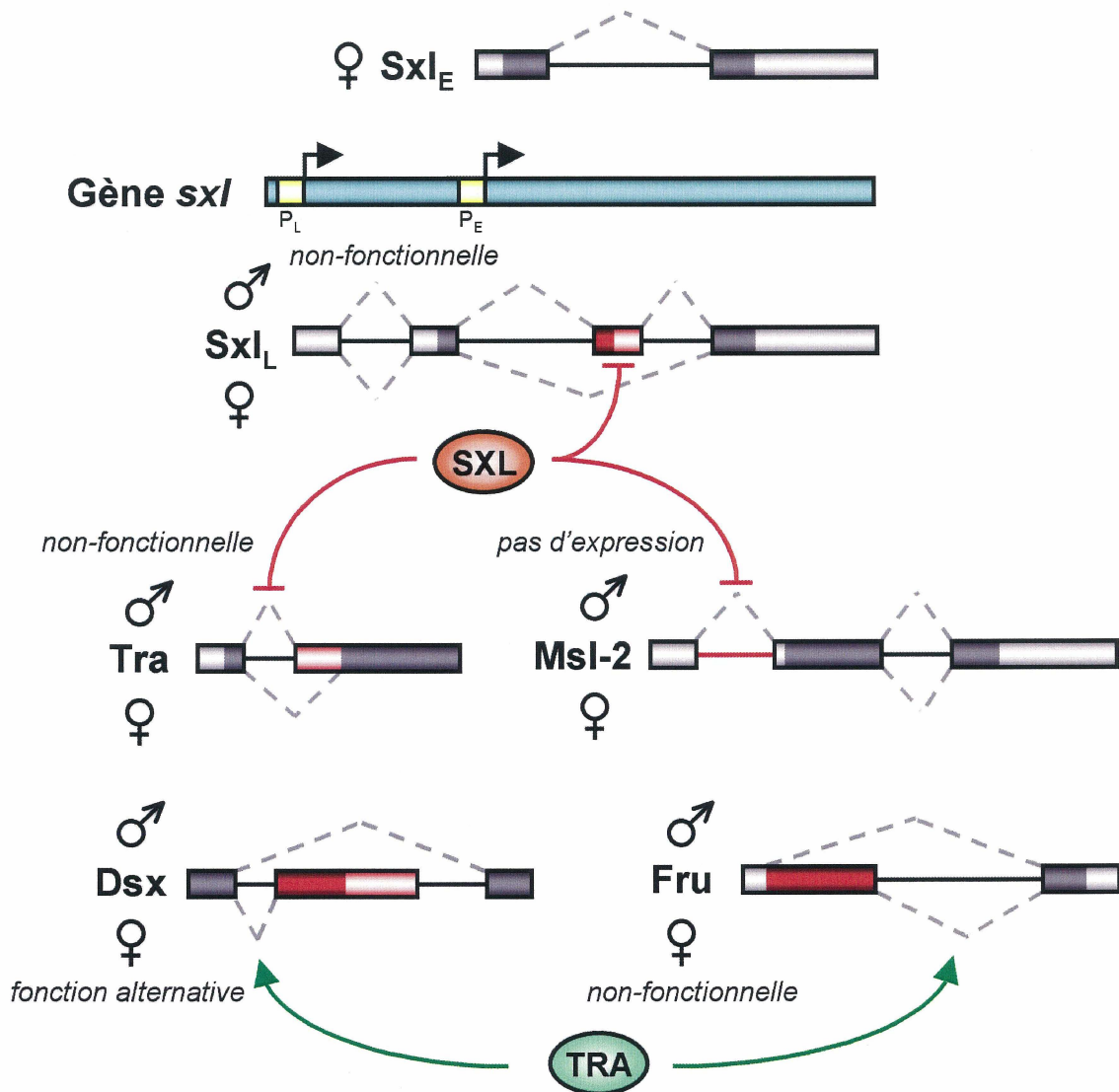


Figure 4 : Cascade d'épissage alternatif responsable de la différenciation sexuelle de *Drosophila*. Pour simplifier, seuls les exons codants sont illustrés (séquences alternatives en rouge, séquences codantes en foncé).

capable d'affecter à son tour l'épissage alternatif d'autres gènes impliqués dans la différenciation sexuelle. En formant un complexe avec la protéine constitutive TRA2, TRA active le site proximal des deux sites d'épissage 3' des exons terminaux alternatifs de *Dsx* («*Doublesex*») (RYNER et BAKER, 1991). *Dsx* code pour un facteur de transcription dont les isoformes, DSX^M et DSX^F établissent le patron d'expression approprié pour la plupart des caractères sexuels somatiques masculin et féminin, respectivement (BAKER et WOLFNER, 1988). Tra affecte également l'épissage alternatif de Fru («*Fruitless*»), un facteur transcriptionnel requis pour l'apparition du comportement de parade sexuel masculin (HEINRICHS *et al.*, 1998).

Chez les mammifères, la régulation de l'épissage alternatif est rarement attribuable à une protéine spécifique, comme c'est le cas pour SXL, mais résulte plutôt de variations précises dans la proportion d'un nombre important de facteurs d'épissage ubiquitaires. Ces facteurs impliqués font généralement partie des mêmes familles de protéines hnRNP et SR (ou des protéines similaires à celles-ci) aussi impliquées dans la reconnaissance des sites d'épissage constitutifs. Les sites d'épissage alternatifs étant généralement plus faibles, c'est-à-dire plus éloignés du consensus que les sites constitutifs, leur sélection dépend plus étroitement de ces facteurs auxiliaires. Par conséquent, toute variation dans les quantités relatives de ces protéines engendrera un répertoire global d'isoformes propre à chaque type cellulaire ou stade de développement (BLACK, 2003). Vu son impact dans mon projet de recherche, j'aborderai maintenant l'une d'elle de façon plus détaillée.

Le facteur d'épissage SRp30c

La famille de protéines SR se divise en deux sous-groupes selon la présence d'un ou deux domaines de liaison à l'ARN de type RRM. SRp30c, notre protéine d'intérêt, figure parmi les membres du deuxième groupe. En plus de ses RRM, cette protéine possède une région charnière constituée de glycines et se distingue des autres membres de sa famille par la parcimonie de dipeptides arginine-serine, trait caractéristique des protéines SR. La protéine pour laquelle SRp30c montre le plus d'homologie est ASF/SF2 (aussi connu sous le nom de SRp30a pour sa comigration dans une région de 30 kDa avec d'autres protéines SR telles SRp30c et SC35/SRp30b) avec une identité globale de 74%. SRp30c possède également un homologue murin fortement conservé qui est exprimé principalement dans le rein, le poumon et la rate, et à un moindre taux dans le foie et l'intestin grêle. Cette protéine est moins abondante dans les tissus du cerveau, du cœur et des muscles squelettiques. Une augmentation de l'expression de SRp30c peut également être observée suite à l'activation des lymphocytes T, un mécanisme impliquant de nombreux événements d'épissage alternatifs, notamment dans l'ARN pré-messager de CD44 et CD45 (SCREATON *et al.*, 1995).

SRp30c semble être impliqué dans l'épissage alternatif du récepteur de glucocorticoïdes. Bien que les régions impliquées restent à être identifiées, elle y favorise l'inclusion de l'exon alternatif 9 β (résultant en la formation de l'isoforme GCR β) plutôt que l'exon 9 α (présent dans GCR α), ce dernier codant pour le domaine de liaison du

ligand. Parallèlement, SRp30c est la protéine SR prédominante chez les neutrophiles, cellules connues pour leur insensibilité aux glucocorticoïdes (XU *et al.*, 2003).

Le gène *SMN1* «*survival motor neuron 1*» code pour une protéine faisant partie d'un complexe impliqué dans plusieurs phénomènes dont l'assemblage des snRNP (PELLIZZONI *et al.*, 2002), la stimulation de la transcription par l'ARN polymérase II via une interaction avec l'ARN hélicase A (PELLIZZONI *et al.*, 2001) et le transport des ARNm de la β -actine le long des axones (ROSSOLL *et al.*, 2003). La perte autosomale récessive de ce gène est responsable de l'amyotrophie spinale. Il existe un gène paralogue, *SMN2*, dont l'ARN pré-messager est épissé de façon alternative et dont l'isoforme conservant l'exon alternatif 7 serait à même de compenser la perte de *SMN1*. Il a été démontré que la surexpression de SRp30c favorise l'inclusion de cet exon alternatif chez certaines lignées cellulaires (figure 5A). Cette stimulation de l'épissage se fait avec l'aide de Tra2 β , l'homologue humain de la protéine TRA de la drosophile, puisque seule cette dernière est capable de lier directement l'enhancer SE2 responsable de cette activité (YOUNG *et al.*, 2002).

Il existe encore très peu de cas recensés où la liaison de SRp30c à un ARN pré-messager est directement responsable de la modulation de son épissage alternatif. Parmi ceux-ci on compte le cas de l'hormone protéique neuronale GnRH (figure 5B). Dans les cellules sécrétant cette hormone, plus particulièrement les neurones de la région préoptique de l'hypothalamus, les trois introns de l'ARN pré-messager de GnRH sont efficacement épissés alors que chez les autres cellules du cerveau, le premier intron,

connu sous le nom «d'intron A», est maintenu. Cette rétention inhibe la traduction de l'hormone par la présence de cadres de lecture ouverts («*upstream open reading frames*») et de répétitions de séquence AUG dans cet intron. Les enhancer ESE3 et ESE4 situés respectivement dans les exons 3 et 4 de GnRH semblent être reconnus par SRp30c alors qu'une autre protéine SR, 9G8, montre de l'affinité pour une région indépendante dans l'exon 3. La protéine Tra2 α est également capable de lier ESE4 et montre une aptitude à interagir directement avec SRp30c et 9G8. Cette interaction semble d'ailleurs favoriser l'association de 9G8 et SRp30c à leurs séquences respectives, sauf dans le cas de ESE3.

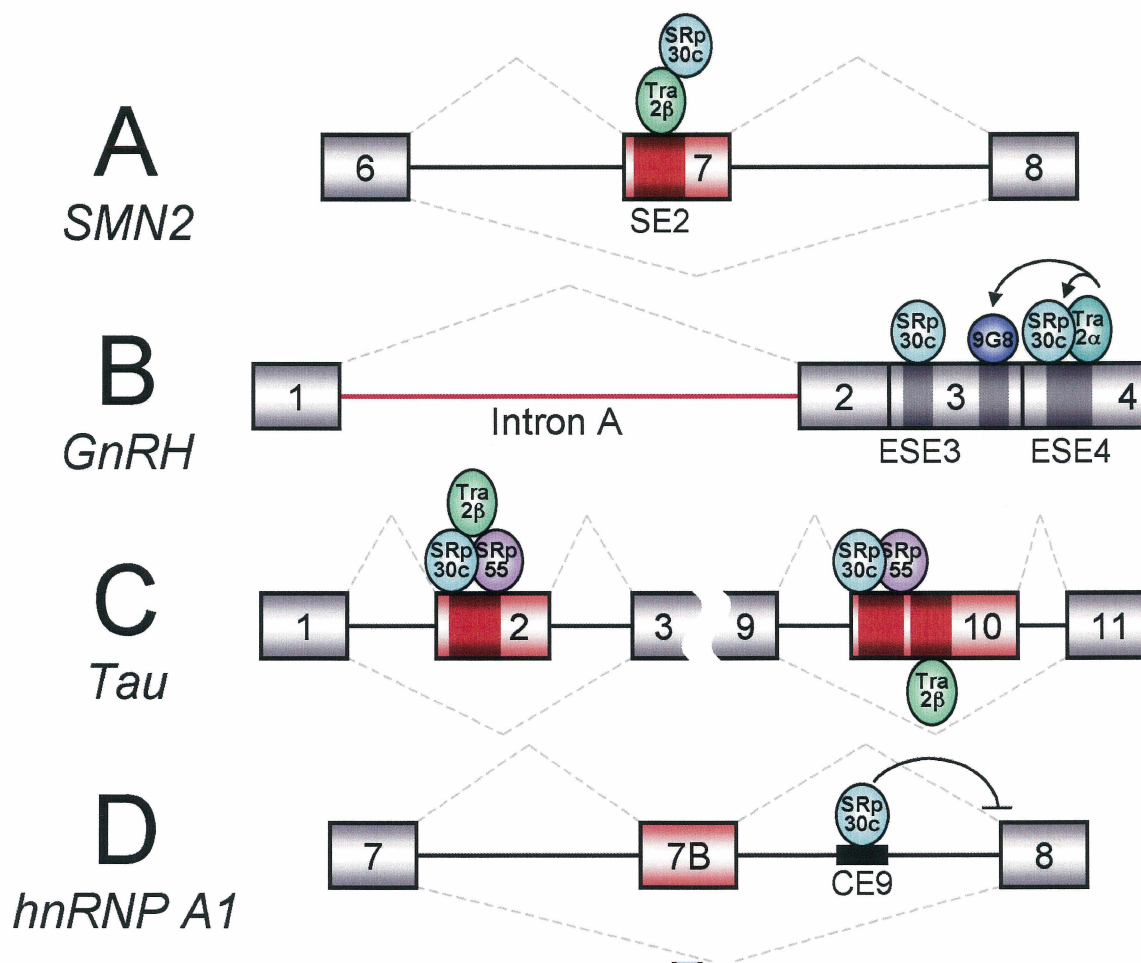


Figure 5 : Implication de SRp30c dans l'épissage alternatif de SMN2, GnRH, Tau et hnRNP A1. Les séquences alternativement épissées sont en rouge, les séquences modultrices de l'épissage sont en rouge ou gris foncé.

Toutes ces protéines sont surexprimées chez la lignée GT1 et semblent également promouvoir l'épissage de l'intron A (PARK *et al.*, 2006).

Les exons 2 et 10 de Tau sont aussi épissés de façon alternative et des mutations affectant la proportion normale des isoformes sont responsables de pathologies telles la dystrophie myotonique de type I et la démence fronto-temporale (FTDP-17). De plus, l'absence de ces exons peut être observée dans le cerveau fœtal, suggérant la présence de silencer. Une étude a d'ailleurs identifié SRp30c et SRp55 comme facteurs responsables de l'activité de silenciers dans les exons 2 et 10 (figure 5C). Il n'est donc pas surprenant de constater qu'une mutation (N279K) capable de favoriser l'inclusion de l'exon 10 inhibe également la liaison de SRp30c. Il a également été démontré que ces deux protéines ont la capacité d'interagir entre-elles et avec la protéine Tra2 β . Cette dernière comporte un caractère ambivalent dans l'épissage de Tau, favorisant l'exclusion de l'exon 2 par l'intermédiaire de SRp30c et SRp55, et stimulant l'inclusion de l'exon 10 par une association directe à un enhancer exonique (WANG *et al.*, 2005). Ces observations sont cependant en contradiction avec un article précédent qui conférait à SRp30c un rôle positif dans l'inclusion de l'exon 10 (KONDO *et al.*, 2004).

Un autre exemple de répression médiée par SRp30c a lieu dans l'ARN pré-messager de hnRNP A1 (figure 5D). L'inclusion de l'exon 7B dans l'ARNm mature entraîne la synthèse de l'isoforme A1B. L'élément CE9, situé dans l'intron suivant cet exon alternatif favorise son inclusion en interférant avec l'épissage au site 3' de l'exon 8 en aval. Ainsi, l'épissage a l'opportunité de s'effectuer entre le site 5' de l'exon 7 et le

site 3' suboptimal de l'exon 7B (SIMARD et CHABOT, 2000). Bien que les mécanismes d'action restent mal connus, SRp30c a été identifiée comme protéine responsable de l'activité CE9 (SIMARD et CHABOT, 2002). Cette activité semble également être réprimée par PTB, une protéine hnRNP habituellement connue pour son caractère répresseur (PARADIS, C. et al., manuscrit soumis).

Un nombre croissant de protéines sont connues pour leur interaction avec SRp30c, parmi celles-ci, on compte les protéines du rat SLM-1 et SLM-2 de la famille de transduction de signal et activation de l'ARN (STAR). Cette interaction pourrait révéler un lien possible entre l'intégration d'un message d'origine extracellulaire et la régulation de la maturation des ARN pré-messagers (STOSS *et al.*, 2004; STOSS *et al.*, 2001).

L'état de phosphorylation des protéines SR est d'une grande importance pour la localisation (COLWILL *et al.*, 1996; GUI *et al.*, 1994) et les interactions avec d'autres protéines (WANG *et al.*, 1998; XIAO et MANLEY, 1998). Ainsi, il n'est pas surprenant d'apprendre que SRp30c puisse lier des protéines telles la phosphatase PIR1 (YUAN *et al.*, 1998) ou encore la protéine adénovirale E4-ORF4, impliquée dans l'inactivation des protéines SR par la formation d'un complexe avec la phosphatase cellulaire PP2A (ESTMER NILSSON *et al.*, 2001). De plus, la protéine p32, qui agit comme inhibiteur d'ASF/SF2 en empêchant à la fois sa phosphorylation et sa liaison à l'ARN, est capable de lier SRp30c, bien que cette association ne semble pas inactiver cette dernière (PETERSEN-MAHRT *et al.*, 1999).

La localisation de SRp30c semble être dépendante de l'état de la cellule. Effectivement, suite à un choc thermique, cette protéine, de même que son homologue ASF/SF2, pourraient être ségrégées aux «corps HAP», corpuscules nucléolaires temporaires aussi connus sous l'appellation «*stress-induced SNB*», via son association à la protéine HAP (DENEGRÉ *et al.*, 2001). Aussi, SRp30c et ASF/SF2 semblent se retrouver dans les granules de stress, structures nucléaires se formant principalement sur le locus 9q12, où elles lieraient les transcrits issus des éléments satellites III pour favoriser l'épissage de ceux-ci ou simplement pour y être confinées (METZ *et al.*, 2004).

À l'inverse, SRp30c pourrait être elle-même impliquée dans la localisation d'autres protéines. La localisation nucléaire de YB-1, protéine liant ADN et ARN, est dépendante de son interaction avec SRp30c. En effet, lors du choc thermique et de la ségrégation de cette dernière aux corps HAP, YB-1 retourne au cytoplasme (RAFFETSEDER *et al.*, 2003). Un mécanisme similaire pourrait être envisageable pour la protéine Nop30, dont la forme majeure possédant un domaine RS et interagissant avec SRp30c est retrouvée principalement dans le noyau alors qu'un isoforme comportant une extrémité C-terminale alternative et dénudée de dipeptide RS demeure dans le cytoplasme (STOSS *et al.*, 1999).

Épissage alternatif et apoptose

L'épissage alternatif semble détenir un rôle central dans le processus de mort programmée de la cellule, aussi connu sous le nom d'apoptose (SCHWERK et

SCHULZE-OSTHOFF, 2005). Effectivement, bon nombre de récepteurs (Fas, LARD) ou adaptateurs (TRAF2, MyDD88) aux signaux apoptotiques externes, de protéases (caspase-2, -9, -10 et c-FLIP), de DNase (CAD) et de facteurs de transcription (p53, p63 et p73) ont leur localisation ou leur activité modifiée selon l'isoforme produit et ce, souvent de façon antagoniste.

Des études génétiques réalisées chez *C. elegans* ont permis d'identifier l'apoptosome, un complexe essentiellement formé par l'oligomérisation de la protéine adaptatrice CED-4, laquelle agit comme échafaudage dans le recrutement et la transactivation par clivage protéolytique de la cystéine protéase CED-3, effectrice de la cascade apoptotique (CHINNAIYAN *et al.*, 1997). Or, l'ARN pré-messager de CED-4 peut être épissé par l'entremise de sites d'épissage 3' en compétition de façon à générer un isoforme plus court, CED-4S agissant plutôt comme inhibiteur de l'apoptose. D'ailleurs sa surexpression engendre des anomalies dans le développement embryonnaire de *C. elegans*, dont la présence de cellules additionnelles dans le pharynx antérieur qui ne parviennent pas à entrer en apoptose (SHAHAM et HORVITZ, 1996).

L'apoptosome est également présent chez les mammifères et est composé de Apaf-1 et de la caspase-9, homologues de CED-4 et CED-3, respectivement (LI *et al.*, 1997; ZOU *et al.*, 1997). La caspase-9 est également susceptible d'être épissée alternativement, et l'un de ces variants, la caspase-9S ne possède pas d'activité protéolytique, vu l'absence du domaine catalytique, mais agit néanmoins comme

dominant négatif en liant Apaf-1, bloquant ainsi l'activation de l'isoforme long (SEOL et BILLIAR, 1999).

Cependant, l'exemple classique et le mieux caractérisé d'activité antagoniste issue de l'épissage alternatif d'un facteur apoptotique demeure sans contredit Bcl-x, qui est précisément le sujet de notre étude.

Rôle de Bcl-x et autres membres de la famille Bcl-2 dans l'apoptose

La recherche d'homologues à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a donné naissance à toute une famille du même nom (ADAMS et CORY, 1998). Les membres de cette famille, qui sont tous fortement engagés d'une façon ou d'une autre dans le contrôle du processus de mort programmée de la cellule, peuvent se subdiviser en trois groupes selon la conservation de quatre domaines d'homologie (BH1-BH4). Généralement, les protéines possédant ces quatre domaines (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w et Mcl-1) partagent aussi une activité anti-apoptotique. Cependant, les protéines ne possédant que les domaines BH1-BH3 (Bak, Bax, Bok/Mtd) ont plutôt une activité pro-apoptotique. Enfin, il existe des membres de la famille Bcl-2 qui ne comportent que le domaine BH3 (Bid, Bad, Puma, Noxa, Nbk/Bik). Ces derniers ont également une activité pro-apoptotique mais celle-ci semble être dépendante de la présence des homologues multi-domaines Bak ou Bax (CHENG *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 2001; ZONG *et al.*, 2001).

Plusieurs détails du rôle de ces protéines dans l'apoptose reste à découvrir, mais plusieurs s'accordent déjà pour proposer que, suite à un stimulus apoptotique, les protéines Bak et Bax sont activées (possiblement par l'intermédiaire des protéines composées uniquement du domaine BH3) et subissent une réorganisation structurale qui entraîne à la fois leur relocalisation à la membrane externe de la mitochondrie et une oligomérisation (ESKES *et al.*, 2000; WEI *et al.*, 2000). Certains membres de la famille Bcl-2 contiennent deux hélices- α hydrophobes ($\alpha 5$ et $\alpha 6$ chez Bax) entourées par d'autres hélices amphipatiques ayant une certaine homologie avec les colicines ainsi que la toxine de la diphtérie (SUZUKI *et al.*, 2000). Par analogie à ces dernières, Il fut dès lors proposé que les protéines pro-apoptotiques multidomaines seraient capables de former des pores, soit par leur simple oligomérisation (ANTONSSON *et al.*, 2000), ou encore par une possible association avec d'autres structures mitochondriales telles les pores de perméabilité transitionnelle (PTP) (NARITA *et al.*, 1998), dans la membrane mitochondriale permettant le relâchement cytoplasmique de composés apoptotiques, dont AIF, cytochrome c, endonucléase G, Omi/HtrA2 ou Smac/Diablo.

La capacité de dimérisation s'étend aussi aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, bien que Bcl-2 et Bcl-x_L sont capables de s'homodimériser (JEONG *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 1994), ces protéines sont également capables de s'hétérodimériser avec leurs homologues pro-apoptotiques, menant à la séquestration de ces derniers (CHENG *et al.*, 2001; KELEKAR *et al.*, 1997; OLTVAI *et al.*, 1993; SATTLER *et al.*, 1997; YIN *et al.*, 1994). C'est là l'une des explications de l'activité anti-apoptotique des protéines Bcl-2 et Bcl-x_L. Leur action ne se limite probablement pas à la ségrégation de

ces facteurs proapoptotiques puisqu'il a été démontré que Bcl-x est capable de lier directement le canal anionique (VDAC), une composante du PTP, et de bloquer son ouverture (SHIMIZU *et al.*, 1999). Enfin, Bcl-x_L a aussi été impliqué dans l'inhibition directe de la formation de l'apoptosome. En effet, des rapports conflictuels confirment ou non la liaison de Bcl-x_L à Apaf-1 (HU *et al.*, 1998; MORIISHI *et al.*, 1999; PAN *et al.*, 1998). Néanmoins, il est intéressant de noter qu'un mécanisme semblable est présent chez le nématode où l'homologue de Bcl-x_L, CED-9 lie l'adaptateur CED-4, empêchant ainsi l'activation de la protéase CED-3 (HENGARTNER et HORVITZ, 1994).

Au-delà de son mode d'action, il est connu que des altérations dans l'expression ou l'activité de Bcl-x ont des répercussions pathologiques importantes. En effet, la surexpression de Bcl-x est intrinsèquement liée au cancer, notamment celui de la prostate, du poumon et le myélome multiple (KRAJEWSKA *et al.*, 1996; REEVE *et al.*, 1996; TU *et al.*, 1998). On lui associe également un rôle dans le phénomène métastatique du cancer du sein (OLOPADE *et al.*, 1997) et la résistance aux agents chimiothérapeutiques (AMUNDSON *et al.*, 2000; DECAUDIN *et al.*, 1997). La surexpression de Bcl-x pourrait aussi avoir une incidence dans les maladies auto-immunes (LOPEZ-HOYOS *et al.*, 1998).

Épissage alternatif de Bcl-x

L'existence d'un second site d'épissage 5' dans l'exon 2 de bcl-x donne lieu à une compétition avec le site 5' normal de Bcl-x_L et sa sélection dans l'épissage au site 3' de

l'exon 3 raccourcit de 189 nucléotides l'ARN messager (figure 6) (BOISE *et al.*, 1993). L'isoforme de 21 kDa produit, nommée Bcl-x_S, ne comporte pas les domaines d'homologie BH1 et BH2. De plus, cette protéine possède une activité pro-apoptotique dépendant du domaine BH3 que l'on associe à sa capacité de dimériser avec l'isoforme majeur, Bcl-x_L, à l'homologue Bcl-2 (CHANG *et al.*, 1999; LINDENBOIM *et al.*, 2001) et à sa possible implication dans l'activation de Bak bien qu'aucune interaction directe avec cette dernière n'ait été démontrée (LINDENBOIM *et al.*, 2005). La surexpression de Bcl-x_S via un vecteur adénoviral, ou encore sa sélection préférentielle par le biais d'un oligonucléotide bloquant l'usage du site d'épissage 5' de Bcl-x_L se sont révélées être des avenues thérapeutiques prometteuses dans le traitement d'un nombre le cancer (CLARKE *et al.*, 1995; EALOVEGA *et al.*, 1996; HAN *et al.*, 1998; SUMANTRAN *et al.*, 2000).

Un autre isoforme fut découvert par criblage d'une banque d'ADNc placentaire humaine avec une sonde correspondant à la région BH1-BH2 de Bcl-2 et fut nommé Bcl-x_β en raison d'une homologie avec l'isoforme murin du même nom (BAN *et al.*, 1998). La séquence laisse supposer l'usage d'un site d'épissage 3' alternatif, 18 nucléotides en aval du site 3' connu pour l'exon 2 (dans la région non-codante) et l'absence d'épissage de l'intron 2, ou du moins l'usage d'un site 5' beaucoup plus en aval que celui de Bcl-x_L. Cette dernière particularité permet la traduction d'une région C-terminale de 39 acides aminés distincte des autres isoformes. Peu de choses sont connues sur cette protéine, mais elle semble interagir avec Bax et on suppose que son action sera fortement dépendante du contexte. En effet, chez la souris Bcl-x_β a un effet anti-apoptotique dans les cellules

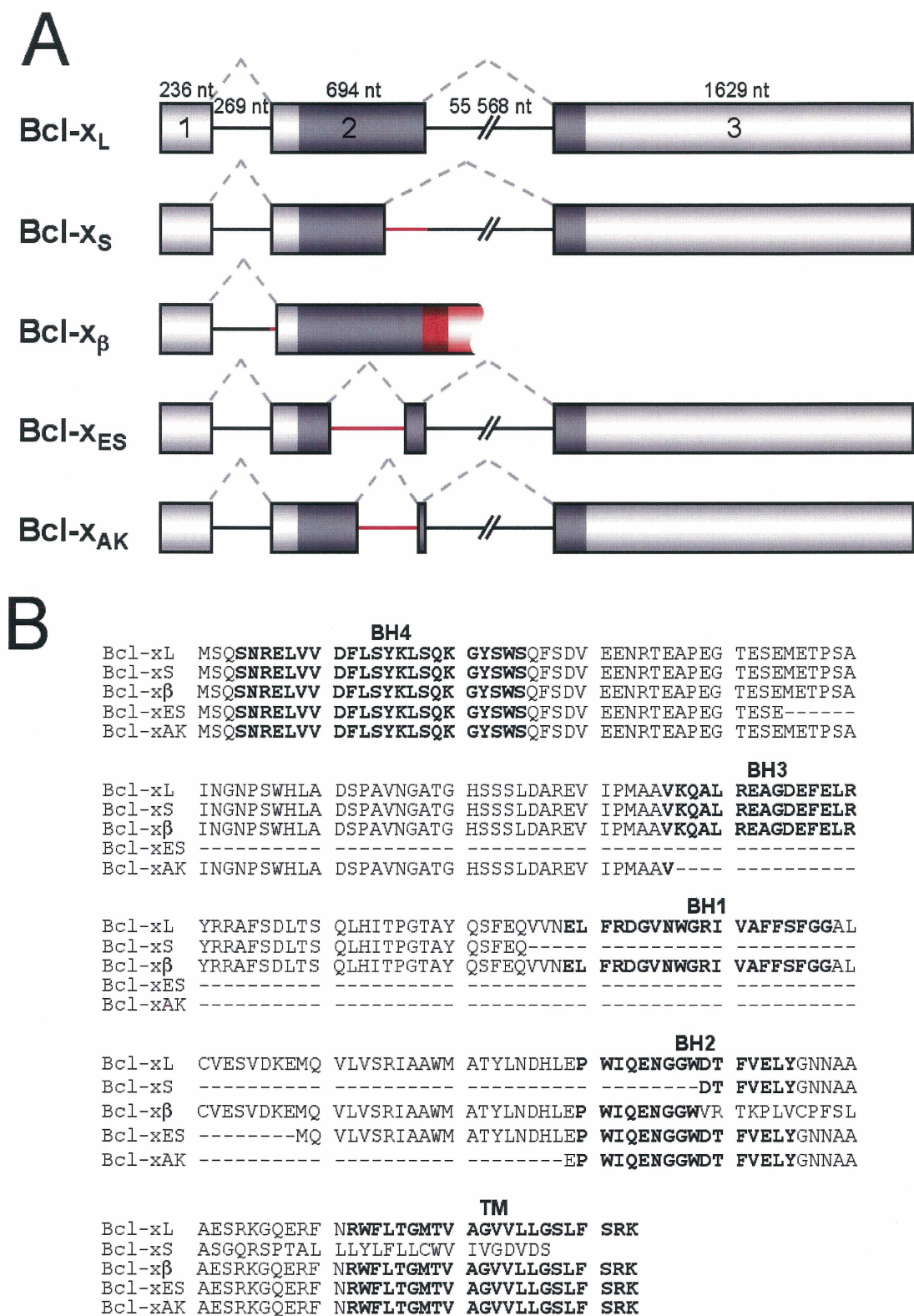


Figure 6 : A Événements d'épissage menant à la formation des différents isoformes de Bcl-x. Les séquences épissées alternativement par rapport à xL sont en rouge, les cadres de lecture ouverts sont en foncé. **B** séquence peptidique des isoformes de Bcl-x.

neuronales (GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 1995), alors que l'homologue du rat entraîne l'apoptose de cellules promyéloïdes (SHIRAIWA *et al.*, 1996).

Plus récemment, deux nouveaux isoformes de Bcl-x ont été caractérisés (Bcl-x_{ES} et Bcl-x_{AK}) qui se distinguent par l'exclusion de régions internes de l'exon 2 donnant lieu à des protéines sans les domaines BH3 et BH1. Ce point commun ne reflète cependant pas une similarité dans leurs actions. Aussi, bien que ce point n'est pas abordé dans les ouvrages qui en font référence, les sites d'épissage pour ces isoformes ne ressemblent en rien aux sites consensus d'épissage dépendant des facteurs U1/U2 ou du système d'épissage AT-AC.

Bcl-x_{ES} est une protéine de 13 kDa exprimée dans la plupart des tissus sauf chez les cellules normales du sein, de l'ovaire, du testicule et du poumon. Elle est présente dans les fractions mitochondriale, cytoplasmique et nucléaire des cellules lymphocytaires Namalwa et diminue l'effet apoptotique des agents cytotoxiques : camptothecin, etoposide, *cis*-platine et TNF- α . Bcl-x_{ES} lie la plupart des membres de la famille Bcl-2 tel que démontré par technique du double hybride chez la levure. De plus, sa liaison à Bax et Apaf-1, confirmée par co-immunoprécipitation, semble prévenir l'oligomérisation de celles-ci suite à un traitement au *cis*-platine (SCHMITT *et al.*, 2004).

Bcl-x_{AK} semble être exprimé surtout chez les mélanomes où cette protéine de 18 kDa fut découverte. Elle se localise à la fois dans le cytoplasme et à la surface des

mitochondries et sa surexpression entraîne l'apoptose d'une manière qui ne semble cependant pas passer par l'activation de la caspase-3 (HOSSINI *et al.*, 2006).

Bien qu'un bon nombre d'isoformes aient été identifiés pour Bcl-x, on en connaît encore peu sur les méthodes employées par la cellule pour en réguler leur production. Il a été démontré qu'une façon inusitée de contrôler l'épissage alternatif d'un gène passe par la sélection du promoteur (CRAMER *et al.*, 1999; KORNBLIHTT, 2005). Dans le cas de Bcl-x, l'analyse de la séquence génomique de l'homologue murin a permis l'identification de cinq promoteurs agissant avec (P3, P4 et P5) (PECCI *et al.*, 2001) ou sans la présence d'une boîte TATA (P1 et P2) (GRILLOT *et al.*, 1997). La nature du tissu semble avoir une influence sur la sélection du promoteur employé pour transcrire Bcl-x. En effet, si l'expression à partir de P1 et P2 semble être ubiquitaire, P3 est employé principalement dans la rate, le foie et le rein, P4 dans l'utérus et rate et enfin P5 dans la rate, le foie et le cerveau. Le choix du promoteur parmi ceux énumérés ici a effectivement une influence sur l'épissage alternatif de Bcl-x. Ainsi, le transcrit produit à partir de P1 favorise Bcl-x_L, alors que P2 peut générer les isoformes murins Bcl-x_L, Bcl-x_S et Bcl-x_γ. P3 quant à lui donne lieu surtout à Bcl-x_γ (PECCI *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 1997). Un système semblable pourrait être envisageable chez l'humain vu la conservation de plusieurs éléments des promoteurs P1, P2 et P3 (GRILLOT *et al.*, 1997; MACCARTHY-MORROGH *et al.*, 2000).

Il existe également des éléments dans la séquence de l'ARN pré-messager qui affecte l'isoforme produit en réponse à certains types de stimuli externes bien que

l'événement étudié se limite souvent au choix entre les sites d'épissage 5' de Bcl-x_L et Bcl-x_S (figure 7).

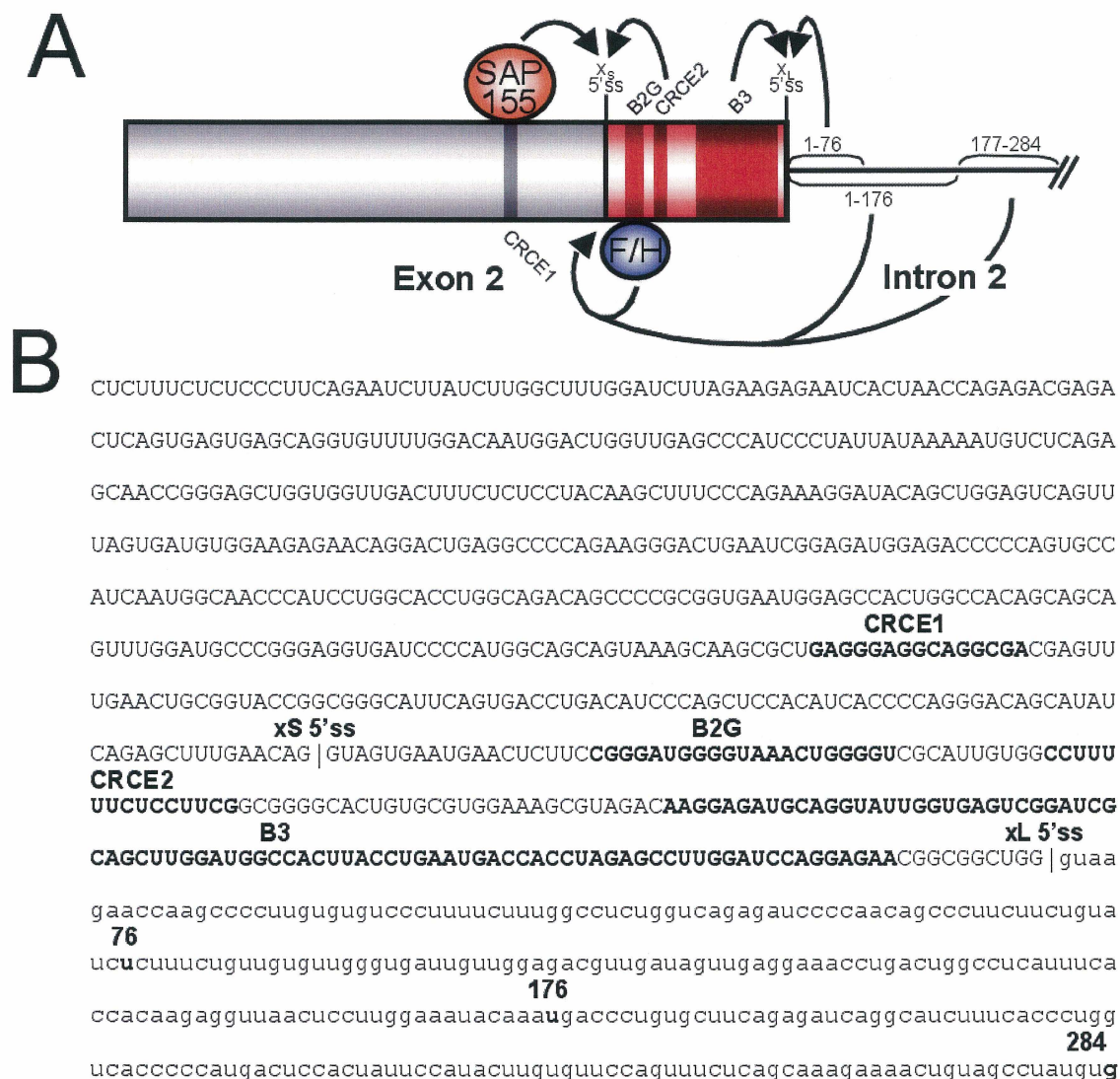


Figure 7 : A Modèle illustrant les éléments impliqués dans l'épissage alternatif de Bcl-x . Les séquences épissées alternativement sont en rouge, les modulateurs sont en rouge ou gris foncé. **B** Séquence nucléotidique de l'exon 2 et des 284 premiers nucléotides de l'intron 2 de Bcl-x.

La céramide, un lipide produit *de novo* ou par l'hydrolyse de la sphingomyéline, est un médiateur important de la réponse de la cellule à une multitude de stress environnementaux. Il a été démontré que cette molécule est capable de renverser l'équilibre entre les isoformes de Bcl-x, favorisant la production de Bcl-x_S (CHALFANT

et al., 2002) et que ce phénomène a lieu par l'intermédiaire de la phosphatase PP1, reconnue pour altérer l'état de phosphorylation des protéines SR (CHALFANT *et al.*, 2001). Par mutagenèse dirigée sur un minigène de Bcl-x, deux régions ont été cernées comme étant responsables de la réponse au traitement à la céramide dans les cellules épithéliales pulmonaires A549 (MASSIELLO *et al.*, 2004). CRCE1 est un élément riche en purines dont la liaison à des protéines de 30, 120 et 215 kDa est accrue suite à un traitement à la céramide. On observe une réaction similaire pour l'élément CRCE2, riche en pyrimidines, avec des protéines de 120 et 76 kDa. Dernièrement, le facteur d'épissage SAP155 a été proposé comme médiateur de l'activité de CRCE1 (MASSIELLO *et al.*, 2006).

D'autres stimuli peuvent altérer le ratio entre les isoformes Bcl-x_L et Bcl-x_S. Parmi ceux-ci, on compte les cytokines IL-6 et GM-CSF qui favorisent Bcl-x_S chez les cellules leucémiques K562. Inversement, un traitement à la 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) entraîne une augmentation du taux de Bcl-x_L, bien que cet effet ne soit observable que dans les cellules gliomales U251. De plus, on suppose que l'effet de la TPA passe par la protéine kinase C (PKC), puisque l'ajout d'un inhibiteur de cette dernière (*erigeron breviscapus*) neutralise l'effet de la TPA. Les régions en *cis* responsables de ces effets semblent toutes se situer dans une région hautement conservée de l'intron 2. Ainsi, on a déterminé par mutagenèse d'un minigène que parmi la séquence nucléotidique suivant le site d'épissage 5' de Bcl-x_L, les 284 premiers sont importants pour l'effet de GM-CSF, alors que pour IL-6 et TPA, cette région se limite au 176 et 76 premiers nucléotides, respectivement (LI *et al.*, 2004).

Tel qu'exposé précédemment, quelques éléments de séquence régulant l'épissage alternatif de Bcl-x en réponse à des signaux environnementaux ont été circonscrits dans l'ARN pré-messager de celui-ci. Cependant, la connaissance des facteurs qui interagissent directement avec ces éléments reste très limitée. Un des cas les plus habilement détaillés demeure l'élément B2G caractérisé par notre laboratoire. Encore une fois, c'est par mutagenèse dirigée sur un minigène de Bcl-x qu'a été délimitée cette région de 30 nucléotides directement en aval du site 5' de Bcl-x_S et pour lequel B2G à une activité enhancer. L'activité de cet élément semble être dépendante des protéines hnRNP F/H. En effet, la liaison de ces protéines via des triplets et quadruplets de guanines entraîne une augmentation du ratio x_S /x_L *in vitro* et la diminution de son expression par interférence à ARN (RNAi) donne l'effet contraire *in vivo* (GARNEAU *et al.*, 2005).

La même étude a également donné lieu à la découverte d'un autre enhancer, mais dont l'activité est plutôt dirigée vers le site d'épissage 5' de x_L. Cet élément, nommé B3 sera d'ailleurs le sujet de ce mémoire. Dans les pages qui suivent, nous discuteront des éléments découverts dans la séquence de B3, de l'implication de la protéine SRp30c dans leur activité, ainsi que des sites d'épissage 5' cryptiques que j'ai identifiés dans cette région.

Matériel et méthodes

Clonage

L'élaboration des plasmides S2.13, S2.13 Δ B3, X2.13 et X2.13 Δ B3 a été effectuée par Daniel Garneau et Timothée Revil (GARNEAU *et al.*, 2005). Le mutant S2.13 Δ AM, également produit par Daniel Garneau, est le résultat d'une digestion par les enzymes de restriction AccI et MscI, et du remplissage des extrémités protubérantes par la polymérase Klenow suivi d'une recircularisation. S2.13 Δ ML est le fruit d'une amplification d'une région du minigène à l'aide des oligos HincII et XL+MscI. Le fragment digéré par HincII et MscI a par la suite été réintroduit dans S2.13 préalablement digéré par les mêmes enzymes.

La plupart des mutants de délétion et de substitution subséquents ont été produits par un protocole de mutagenèse dirigée similaire. Tout d'abord, un oligo sens fut employé avec l'oligo HincII et, dans une réaction séparée, on a combiné l'oligo anti-sens (partiellement complémentaire à l'oligo sens) et l'oligo NcoI pour une première ronde d'amplification sur S2.13 (tableau 1). Les deux produits ont par la suite été mis en commun pour une deuxième amplification médiée par les oligos NcoI et HincII. Le fragment résultant, tout comme le plasmide S2.13 furent alors digérés par les enzymes NcoI et HincII pour finalement procéder à une ligation. Dans le cas de preX_SB3, un fragment d'amplification synthétisé à partir des oligos AvT3 et B3end sur S2.13 fut digéré par AccI. Le fragment de digestion correspondant à l'élément B3 fut alors purifié

par extraction sur gel, puis cloné dans le mutant ANEX_S (minigène S2.13 dont le site AccI natif a été inactivé par digestion par AccI et polymérase Klenow, puis dans lequel on a ajouté par mutagenèse dirigée les sites de restriction AccI, NdeI et EcoRV en amont du site d'épissage 5' de x_S) digéré par les enzymes AccI et EcoRV.

Stratégie	Mutant	Oligo sens	Oligo anti-sens
<p>1er PCR (2 réactions séparées)</p> <p>anti-sens ← HincII</p> <p>5' 3'</p> <p>3' 5'</p> <p>NcoI → sens</p> <p>2e PCR</p> <p>NcoI → 5' 3'</p> <p>3' 5'</p> <p>HincII ←</p> <p>Digestion et clonage</p> <p>5' 3'</p> <p>3' 5'</p>	ΔmidB3	MidB3	AM3
	ΔAM1	AM2	AM1
	ΔAM2	AM4	AM3
	ΔML1	ML2	ML1
	ΔML2	ML4	ML3
	ΔmidAM	MidAM2	MidAM1
	ΔmidMID	MidMID2	MidMID1
	ΔmidML	MidML2	MidML1
	ΔpostB3	Post2	Post1
	CC→GG	ML2cc2	ML2cc1
	GG1→CC	ML2gg2	ML2gg1
	GG2→CC	ML2gg4	ML2gg3
	GG2→UU	ML2gg5	ML2gg6
	ANEX _S	ANEXS1	ANEXS2
	noX _L	X-LM2	X-LM2r
	Strong x _M	strongXmfow	strongXmrev
	Weak x _M	weakXmfow	weakXmrev

Tableau 1 : Oligos employés lors du protocole de mutagenèse dirigée.

Pour obtenir les plasmides destinés aux expériences *in vivo*, j'ai d'abord digéré les mutants de S2.13 par XhoI, puis rempli les extrémités protubérantes 5' à l'aide de la polymérase Klenow pour enfin procéder à une deuxième digestion par XbaI. Les fragments purifiés ont été introduits dans le vecteur pcDNA3.1(+) clivé aux sites EcoRV et XbaI.

Le vecteur de surexpression de SRp30c est issu de l'amplification de l'ADNc de SRp30c à partir du plasmide pQE80L/SRp30c (servant à la production de His-SRp30c par baculovirus) avec les oligos SRp30cXbaI et SRp30cEcoRI. Le fragment isolé est digéré avec les enzymes de restriction XbaI et EcoRI puis cloné dans le plasmide pcDNA3.1(+) linéarisé par les mêmes enzymes.

Transfection

Dans le cas de transfections avec de l'ADN plasmidique, 3×10^5 cellules HeLa S3 sont menées à 30-50% de confluence puis transférées dans 500 μ l de DMEM (Wisent) pour y être transfectées par l'ajout de 5 μ g de polyéthylénimide (Polysciences) incubé au préalable avec 1 μ g de plasmide dans 200 μ l d'Opti-MEM I (Gibco). Suite à une incubation de 6 heures à 37°C avec 5% CO₂, la culture se poursuit de 24 à 48 heures par l'ajout de 1,5 ml de DMEM supplémenté à 10% de sérum fœtal bovin (Wisent).

Les expériences d'interférence à ARN s'effectuent plutôt avec 2×10^5 cellules dans 800 μ l de DMEM 10% FBS, lesquelles sont transfectées par l'ajout d'un mélange composé de 4 μ l d'oligofectamine (Invitrogen), 80 pmoles de duplex d'oligo (IDT) et dont le volume a été complété à 200 μ l avec de l'Opti-MEM I. Le tout est incubé 6 heures à 37°C avec 5% CO₂, puis on reprend la culture avec 1 ml de DMEM 10% FBS supplémentaire. Le lendemain, la procédure est répétée et les cellules sont finalement récoltées 72 heures plus tard.

Pour les expériences de co-transfection, nous avons employé le protocole d'interférence à ARN en débutant avec $1,5 \times 10^5$ cellules. Ce protocole se termine par une transfection des plasmides et une croissance de 48 heures, tel que décrit ci-haut.

Les transfectants stables sont obtenus par une transfection initiale de 1×10^6 de cellules HeLa S3 avec les plasmides pcDNA3.1 (+) ou pcDNA3.1/SRp30c selon le protocole décrit précédemment. Après 24 heures d'incubation, les cultures sont divisées en 4 pétris 60 mm, puis laissées environ 8 heures dans 2 ml de DMEM 10% FBS pour ensuite remplacer le milieu pour 2 ml de DMEM 10% FBS, 700 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin (Gibco). Les cultures sont incubées environ une semaine à 37°C avec 5% CO_2 en remplaçant le milieu aux 3 jours. Des colonies résistantes sont identifiées par microscopie, puis isolées avec des anneaux de clonage. Ces colonies sont ensuite récoltées et cultivées environ 8 heures dans des plaques 24 pistes contenant chacun 1 ml de DMEM 10% FBS. Après 8 heures d'incubation, le milieu est remplacé par du DMEM 10% FBS, 700 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin et les cellules sont cultivées jusqu'à confluence. À ce stade, les cultures sont prélevées et transférées dans des flacons de 25 cm^2 contenant 5 ml de DMEM 10% FBS, 400 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin.

Extraction d'ARN

Le milieu des cellules est retiré suite à une centrifugation et celles-ci sont resuspendues dans 400 μl de TRIzol (Invitrogen). Après 5 minutes d'incubation, on ajoute 80 μl de chloroforme et une centrifugation de 12 000 $\times g$ à 4°C est effectuée pour

15 minutes. La phase supérieure prélevée est ajoutée à 200µl d'isopropanol et incubée 10 minutes avant de passer à une seconde centrifugation de 12 000×g à 4°C pendant 10 minutes. Le culot est nettoyé avec 400 µl d'éthanol 75%, puis resuspendu dans 10 µl d'eau nanopure.

Transcription in vitro

Pour les ARN utilisés dans des expériences d'épissage *in vitro*, les substrats employés ont été produits par amplification avec la polymérase commerciale Pfu Turbo (Stratagene) à l'aide des oligos AvT3 et X2B (0,1 µg/µl) sur le plasmide S2.13. Une fois séparé sur gel d'agarose 0,8%, ce fragment fut purifié par QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) et élué à l'aide de 51,5 µl d'eau nanopure. On y ajoute alors 20 µl de tampon SP6 (1 M Tris-HCl pH 7,5, 1 M MgCl₂, 1 M spermidine, 1 M DTT), 10 µl d'un mélange des ribonucléotides adénosine:cytosine:guanosine (selon un rapport 5:5:1 mM), 10 µl d'uridine 5 mM, 8 µl d'analogue de structure coiffe m⁷G(5')ppp(5')G (Amersham), 2 µl de RNAGuard (Amersham), 0,5 µl de [α-³²P] UTP 800 Ci/mme (PerkinElmer) et 2 µl de ARN polymérase du phage T3 (120 U/µl produite par Catherine Desrosiers). Le mélange est incubé une heure à 37°C, puis séparé sur gel dénaturant (8 M d'urée) de 4% polyacrylamide (38:2 acrylamide:bis-acrylamide). La bande identifiée par autoradiographie est excisée, broyée et incubée à 2 reprises dans 300 et 200 µl d'une solution NaOAc 0,3 M et 0,1% SDS pendant 30 minutes avec rotation. Après chaque incubation, le mélange est soumis à une centrifugation de 5 minutes à 13 000×g et le surnageant est recueilli. On effectue par la suite deux extractions au

phénol/chloroforme/isoamylalcool et une précipitation à l'éthanol. Le culot est dosé à l'aide du compteur à scintillation QC-4000 (Bioscan), puis resuspendu à raison de 2 fmoles/ μ l.

Alternativement, des substrats pour le même transcrit ont été produits par la digestion par l'enzyme de restriction SacII (New England Biolabs) du même plasmide purifié par HiPure Plasmid MidiPrep Kit (Invitrogen). L'ADN est ensuite purifié par extraction au phénol/chloroforme/isoamylalcool et précipité à l'éthanol pour être resuspendu dans 75 μ l d'eau nano pure. Deux microgrammes de ce substrat est par la suite employé pour la réaction de transcription décrite ci-haut.

Dans le cas des ARN destinés à l'expérience de pontage aux ultra-violets, des substrats correspondant à la région B3 ont été produits par PCR tel que décrit précédemment à l'aide des oligos T3B3 (lequel contient le promoteur pour la polymérase T3) et X-5L (0,1 μ g/ μ l) sur le plasmide S2.13. L'ADN est séparé, puis extrait d'un gel d'agarose 3% et précipité à l'éthanol en présence de 35 μ g de glycérol. Le culot est resuspendu dans 2,3 μ l d'eau nano pure auquel on ajoute 1,25 μ l de tampon SP6, 0,625 μ l du mélange des ribonucléotides adénosine:cytosine:guanosine, 0,625 μ l d'uridine 100 μ M, 0,25 μ l de RNAGuard, 1,25 μ l d'uridine [α - 32 P] et 0,25 μ l de polymérase T3.

Épissage in vitro

Deux fmoles de transcrit ont été incubé pendant 2 heures à 30°C en présence de 0,5 µl de créatine kinase 2 U/µl (Roche), 0,5 µl d'ATP 12,5 mM, 0,5 µl de MgCl₂ 80 mM, 0,5 µl de créatine phosphate 0,5 M, 0,25 µl de RNAGuard, 0,25 µl de DTT 100 mM, 2,5 µl de PVA 13% et 5 µl d'extrait nucléaire de cellules HeLa S3 (produit par Johanne Toutant) (DIGNAM *et al.*, 1983). À ce mélange, on peut ajouter des protéines recombinantes dans un volume de 2,5 µl complété avec du tampon-D (20 mM HEPES pH 7,9, 100 mM KCl, 20% glycérol, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF et 0,5 mM DTT). La réaction est stoppée par l'ajout de 450 µl d'une solution NaOAc 0,3 M et 0,1% SDS. Suite à une extraction au phénol/chloroforme/isoamylalcool et à une précipitation à l'éthanol en présence de 35 µg de glycogène, le culot est resuspendu dans 10 µl d'eau nanopure.

RT-PCR

Dans le cas des réactions d'épissage *in vitro*, 2 µl des produits d'épissage ont été rétrotranscrits pendant une heure à 37°C en présence de 5,25 µl d'eau sans ARNase, 1 µl de tampon, 1 µl d'un mélange de déoxyribonucléotides (5 mM chacun), 0,5 µl de rétrotranscriptase Omniscript (tous les réactifs mentionnés précédemment sont contenus dans le kit de QIAGEN), 0,15 µl de RNAGuard et 0,1 µl de l'oligo X2B (0,1 µg/µl).

Un microlitre des ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par l'ajout de 0,2 µl d'ADN polymérase Taq (5 U/µl), 2,5 µl du tampon de réaction (tous deux synthétisés par Catherine Desrosiers), 20 µl d'eau nanopure, 0,2 µl d'un mélange de deoxyribonucléotides (tous à 10 mM), 0,5 µl des oligos X2 et X3 (0,1 µg/µl) et 0,1 µl de [α - 32 P] dCTP 3000 Ci/mme (PerkinElmer). Les échantillons sont initialement dénaturés 3 minutes à 95°C puis soumis à 35 cycles de 15 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 30 secondes d'élongation à 72°C. On termine avec 3 minutes d'élongation à 72°C.

Après une migration sur gel d'acrylamide 4% (29:1 acrylamide:bis-acrylamide), on expose 2 heures sur cassette pour finalement analyser les résultats à l'aide du Phosphor Imager STORM 860 (Amersham).

Pour ce qui est de l'épissage *in vivo*, la procédure reste sensiblement la même, sauf qu'on utilise 0,125 µl d'oligo RT3 (0,1 µg/µl) et 1 µl d'hexamère (0,5 µg/µl) pour la rétrotranscription de X2.13 et Bcl-x endogène. Le PCR s'effectue par les oligos RT2 et X3 pour X2.13 et la température d'hybridation est diminuée à 55°C. Enfin, seulement 20 minutes d'exposition sont nécessaires sur cassette.

Gel de retardement

1,5 µl d'oligo d'ARN (100 pmoles/µl) sont d'abord marqués en incubant pendant 45 minutes à 37°C en présence de 5 µl d'eau nano pure, 2,5 µl de [γ - 32 P] ATP 3000

Ci/mme (PerkinElmer), 1 µl de tampon PNK (10×) et 0,5 µl de polynucléotide kinase du phage T4 (New England Biolabs). L'enzyme est par la suite inactivée en chauffant 10 minutes à 68°C. On ajoute ensuite 20 µl d'eau nanopure au mélange qui est alors purifié sur une colonne MicroSpin G-25 (Amersham).

Un gel d'acrylamide 5% (29:1 acrylamide:bis-acrylamide) contenant de 50 mM de Tris, 50 mM de glycine et 5% de glycérol est réchauffé pendant 30 minutes au préalable à 130 V. Pendant ce temps, on prépare les protéines recombinantes ou extraits nucléaires qu'on complète à 3 µl avec du tampon D, lequel est ajouté à 5 000 cpm d'oligo marqué. On y incorpore la moitié d'un mélange d'épissage *in vitro* (sans créatine kinase) et on incube sur glace 5 minutes avant d'ajouter 1,75 µl d'un mélange constitué de 25 µg/µl d'héparine, 25% de glycérol, 0,5 mM EDTA, 0,2% Bleu de bromophénol. On analyse le gel par autoradiographie en exposant celui-ci au moins 16 heures sur un film XAR (Kodak) avec un écran réflecteur.

Immunobuvardage de type Western

Pour les cultures transfectées dont on veut simultanément extraire ARN et protéines, 2/3 et 1/3 du volume total sont respectivement réservés à cette fin. La partie destinée à l'extraction des protéines est nettoyée au PBS (Wisent), puis soniquée dans 50 µl de colorant de Laemmli (20% glycérol, 10% β-mercaptoéthanol, 4,6% SDS, 0,125 M Tris, 0,1% bleu de bromophénol) et dosée par la méthode de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). 25 µg de protéines sont alors séparées sur gel SDS-PAGE 10%, puis fixées par

électro-transfert sur une membrane de nitrocellulose PROTAN (PerkinElmer). Cette membrane est bloquée par incubation pendant 1 heure dans une solution TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6) supplémentée à 5% de lait en poudre. Une première série d'anticorps (α -SRp30c 1:2000, Chemicon) est alors hybridée à la membrane pendant une heure dans la solution TBST-lait 5%. Suite à un nettoyage au TBST, on procède à l'hybridation de l'anticorps secondaire (α -lapin IgG/peroxidase de raifort 1:5000, Amersham) pendant une heure à 4°C dans du TBST. La membrane est nettoyée à nouveau avec la même solution et le complexe est révélé par chimioluminescence grâce au Western Lightning (PerkinElmer) sur Hyperfilm ECL (Amersham).

Pontage aux ultra-violets

À l'aide du compteur à scintillation QC-4000 (Bioscan), 50 000 cpm de transcrit sont prélevés, puis incubés 10 minutes à 30°C dans un mélange d'épissage *in vitro* dans lequel on a omis le RNAGuard. L'échantillon est par la suite exposé à une radiation de 500 mJ dans l'UV Stratalinker 2400 (Stratagene), puis digéré par 1 μ g/ μ l d'ARNase A durant 30 minutes à 37°C.

Une étape d'immunoprécipitation peut être ajoutée à ce protocole en ajoutant 2,5 μ l d'anticorps et en laissant incuber 30 minutes à 4°C avec rotation. 50 μ l de billes de protéine A sépharose CL-4B activées (Amersham) sont alors ajoutées, puis incubées 15 minutes à 4°C avec rotation. Les billes sont alors nettoyées 4 fois par centrifugation à

500×g pendant 20 secondes dans 1 ml de solution NET-2 (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0,05% Nonidet P-40 (Roche), 0,5 mM DTT).

Les échantillons sont resuspendus dans du colorant de Laemmli, puis incubés 5 minutes à 100°C et séparés sur gel SDS-PAGE 10%, lequel sera analysé par autoradiographie (exposition de 72 heures sur film XAR).

Chromatographie d'affinité à l'ARN

Vingt-cinq nmoles d'ARN sont couplés à 500 µl de billes d'acide adipique agarose 50% (Sigma) selon les consignes du manufacturier. On incubé alors 25 µl de ces billes dans 93,75 µl de mélange d'épissage sans PVA pendant 10 minutes à 30°C. Les billes sont nettoyées 2 fois par l'ajout de 400 µl de tampon D à 1 mM de DTT et avec 5 mM de MgCl₂, suivi d'une centrifugation de 350×g pendant 20 secondes. Deux éluions sont alors effectuées de la même façon avec 200 µl du même tampon suivi de deux autres lavages à 400 µl. Ces dernières étapes sont répétées avec du tampon D (1 mM de DTT, 5 mM de MgCl₂) à 250, 500 et 1000 mM de KCl.

Les protéines sont précipitées à l'acide trichloro acétique et séparées sur gel SDS-PAGE 10%. Celui-ci est par la suite coloré au nitrate d'argent SilverQuest (Invitrogen) et les bandes d'intérêts sont excisées, puis envoyées pour analyse au Centre Innovation Génome Québec de l'Université McGill.

Séquence des oligonucléotides

AM1	CTACGCTTTCCACGCACAGTGCC
AM2	GCGTGGAAGCGTAGAGTCGGATCGC
AM2 (ARN)	UGAGUCGGAUCGCAGCUUGGAUGGCCAC
AM3	CACCAATACCTGCATCTCCTT
AM4	GCAGGTATTGGTGCCACTTACCTG
ANEXS1	TCACCCCAGGGTAGACATATGATATCTTTGAACAGG
ANEXS2	CCTGTTCAAAGATATCATATGTCTACCCTGGGGTGA
AvT3	GACCATGATTACGCCAAGCG
B3end	GTTCTCCTGGATCCAAGGCTCT
HincII	TCCAAGGAGTTAACCTCTTG
MidAM1	GCATCTCCTTGTCTACGCTTTCC
MidAM2	CAAGGAGATGCAGCTTGGATGGC
midAM (ARN)	GCAGGUAAUUGGUGAGUCGGAUCGC
MidMID1	GCGATCCGACTCACCAATACCTG
MidMID2	AGTCGGATCGCAATGACCACCTA
MidML1	CAGGTAAGTGGCCATCCAAGCTG
MidML2	CCACTTACCTGTCCAGGAGAACG
MidB3	GCAGGTATTGGTGAGAGCCTTGG
ML1	CCATCCAAGCTGCGATCCGAC
ML2	GCAGCTTGGATGGAGAGCCTTGG
ML2 (ARN)	CCUAGAGCCUUGGAUCCAGGAGAACG
ML3	AGGTGGTCATTTCAGGTAAGTGGC

ML4	GAATGACCACCTCGGCGGCTGG
ML2cc1	CTGGATCCAACCCTCTAGGTGG
ML2cc2	CCACCTAGAGGGTTGGATCCAG
ML2gg1	TCTCCTGGATGGAAGGCTCTAG
ML2gg2	CTAGAGCCTTCCATCCAGGAGA
ML2gg3	CCGCCGTTCTGGTGGATCCAAG
ML2gg4	CTTGGATCCACCAGAACGGCGG
ML2gg5	CTTGGATCCATTAGAACGGCGG
ML2gg6	CCGCCGTTCTAATGGATCCAAG
NcoI	GAGGTGATCCCCATGGCAGCAG
Post1	TCCTGGATCCAAGGCTCTAGGTGG
Post2	TGGATCCAGGATGGGTAAGAACCAG
RT2	CGGGCTGCAGGAATTCGATT
RT3	GAAGGCACAGTCGAGGCTG
S21 (ARN)	ACAAAGGACGGCACAGGACA
S21-cccc (ARN)	ACAAACCACGGCACACCACA
SRp30cEcoRI	CAGTGTGGTGGGAATTCATGTCGGGCTGG
SRp30cXbaI	AAACGGGCCCTCTAGATCAGTAGGGCCT
siSRp30c1 (ARN)	CCUACAAGAAGAUCUGAUUTT
siSRp30c2 (ARN)	AAUCAGAUUCUUCUUGUAGGTT
strongXmfow	GTACAGGTAAGTCGGATCGCAGCTTG
strongXmrev	CCGACTTACCTGTACCTGCATCTCCT
T3B3	AATTAACCCTCACTAAAGGGACAAGGAGA

weakXmfow	GTATTCCAGAGTCGGATCGCAGCTTG
weakXmrev	CCGACTCTGGAATACCTGCATCTCCT
X2	TCATTTCCGACTGAAGAGTGA
X2B	CGCTCTAGAACTAGTGGATC
X3	ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG
XL+MscI	ATATAATGGCCAGGCGGCTGGGTAA
X-5L	TGGTTCTTACCCAGCCGCCG
X-LM2	GAACGGCGGCTTCTACCTAACCAAGC
X-LM2r	GCTTGGTTAGGTAGAAGCCGCCGTTC

Résultats

A) L'activité enhancer de l'élément B3 est localisée dans deux sous-régions : AM2 et ML2

Une étude précédente avait identifié l'élément B3 (représenté dans la figure 8A) comme étant une région de l'ARN pré-messager de Bcl-x agissant comme enhancer dans la formation de l'isoforme Bcl-x_L (GARNEAU *et al.*, 2005). Cette observation fut réitérée ici puisque l'on observe que l'épissage *in vitro* de l'ARN pré-messager du minigène S2.13 de Bcl-x suivi d'un RT-PCR donne des produits d'amplification correspondant à Bcl-x_L qui sont 6,9 fois plus abondants que ceux correspondant à l'isoforme Bcl-x_S, alors que la délétion de l'élément B3 fait passer ce ratio à 0,4 (figure 8B, pistes 3 et 4).

J'ai créé par mutagenèse dirigée une série de mutants de délétion dans l'élément B3 afin de cerner avec plus de précision les régions responsables de son activité (figure 8A). Une première série de délétions, Δ AM et Δ ML, correspondant respectivement à la première et deuxième moitié de B3 montre que les éléments importants de B3 résident plutôt dans la portion ML. En effet, la délétion de ML fait passer le ratio des produits d'épissage x_L/x_S de 6,9 à 0,7 alors que Δ AM produit un ratio semblable à celui obtenu par l'épissage du transcrit S2.13 sauvage (figure 8B, pistes 5 et 6). Une autre délétion, Δ midB3, de taille semblable à ML et AM a été réalisée en plein milieu de B3. Cette délétion a un impact similaire à la délétion de ML (figure 8B, piste 11), suggérant que l'activité enhancer de B3 pourrait être située dans la première moitié de ML (partie

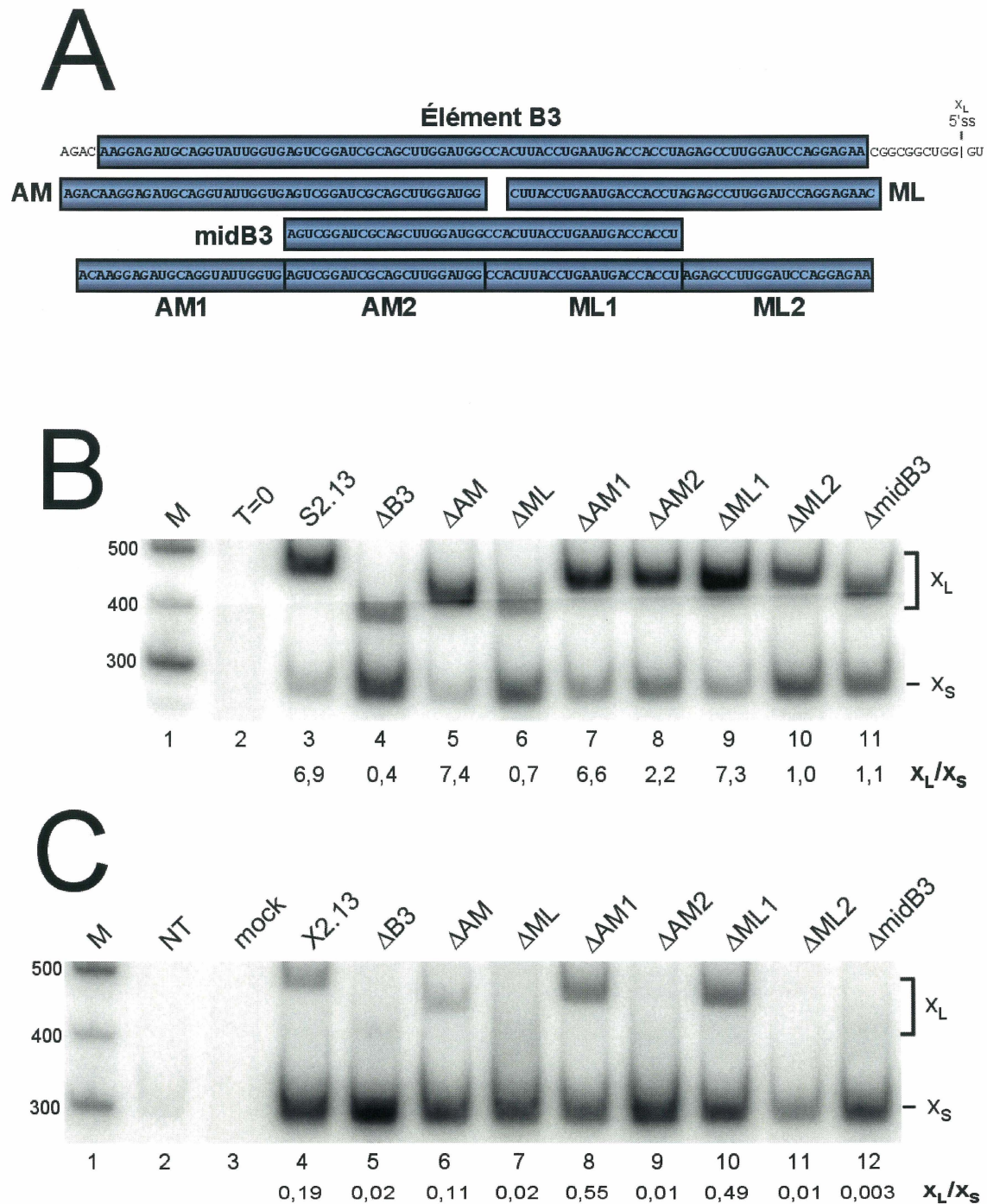


Figure 8, L'activité enhancer de l'élément B3 est localisée dans deux sous-régions : AM2 et ML2 :
A Illustration de l'élément B3 (correspondant aux nucléotides 835 à 920 de l'ADNc de Bcl-x, numéro d'accèsion GenBank NM_138578) et des différentes régions délétées. Résultats in vitro (**B**) et in vivo (**C**) de ces délétions sur un minigène tels qu'obtenus par RT-PCR. « x_L/x_S » réfère au rapport des différents isoformes produits par épissage alternatif dosés par autoradiographie.

commune à midB3 et ML). Afin de confirmer ceci, j'ai délété de plus petites régions localisées dans les portions AM et ML. Cependant, c'est la délétion Δ ML2 (deuxième moitié de ML) qui eu l'impact le plus important sur l'épissage alternatif de Bcl-x (figure 8B, piste 10). Il est également surprenant de noter que la délétion de la région AM2 engendre une variation semblable dans le ratio x_L/x_S , alors que Δ AM était essentiellement sans effet (figure 8B, piste 8). Cette différence suggère la présence d'un silencer dans AM dont la délétion combinée avec celle de l'enhancer AM2 expliquerait l'absence de variation dans le profil d'épissage de Δ AM.

La transfection de ces mutants dans les cellules HeLa S3 permet de confirmer *in vivo* les observations relatées ci-haut. Le minigène employé pour cette occasion, X2.13, est identique en séquence à S2.13 mais son expression *in vivo* fait appel à un promoteur CMV alors que S2.13 était transcrit *in vitro* en utilisant son promoteur T3. Il faut cependant noter que l'isoforme dominant produit à partir de X2.13 étant Bcl- x_S , toute mutation favorisant la formation de celui-ci occasionnera un ratio x_L/x_S avoisinant systématiquement le zéro. Ainsi, on observe la quasi-disparition de l'isoforme Bcl- x_L pour les mutants Δ B3, Δ ML, Δ AM2, Δ ML2 et Δ midB3 (figure 8C, pistes 5, 7, 9, 11 et 12). Donc, on peut affirmer avec plus de certitude que ces régions contiennent effectivement des enhancers favorisant l'utilisation du site d'épissage 5' de Bcl- x_L .

B) Découverte d'un silencer et d'un élément impliqué dans la liaison de la protéine SRp30c

Une nouvelle série de délétions et de mutations a été effectuée dans le but de confirmer et clarifier l'analyse des résultats obtenus précédemment (figure 9A).

Premièrement, bien que les délétions $\Delta AM2$ et $\Delta ML2$ aient entraîné une diminution du ratio x_L/x_S *in vitro*, l'ampleur n'était pas de l'ordre de $\Delta B3$. Pour s'assurer que nous avons identifié tous les éléments enhancer dans B3, j'ai réalisé une délétion simultanée des régions AM2 et ML2, nommée $2 \times \Delta$. Nous constatons alors que cette délétion engendre un ratio des produits de x_L/x_S qui s'apparente à celui obtenu à partir de $\Delta B3$ (figure 9B, comparer pistes 4 et 5).

La délimitation des régions AM1, AM2, ML1 et ML2 ayant été déterminée de façon arbitraire, il est possible que les régions importantes aient été mal cernées. Une série de délétions centrées sur les frontières de ces régions nous a permis de découvrir que l'élément identifié dans AM2 se situe probablement dans sa deuxième moitié, puisque le même effet est présent dans $\Delta midMID$ (deuxième moitié de AM2, première de ML1 ; figure 9B, piste 7). Cette observation peut d'ailleurs expliquer le fait que la délétion de $midB3$ avait eu un effet plus prononcé que AM2 et de l'ordre de ML2 (figure 8B, pistes 8, 10 et 11). De plus, on peut croire que l'élément présent dans ML2 était effectivement bien cerné, puisque $\Delta midML$ (deuxième moitié de ML1, première de

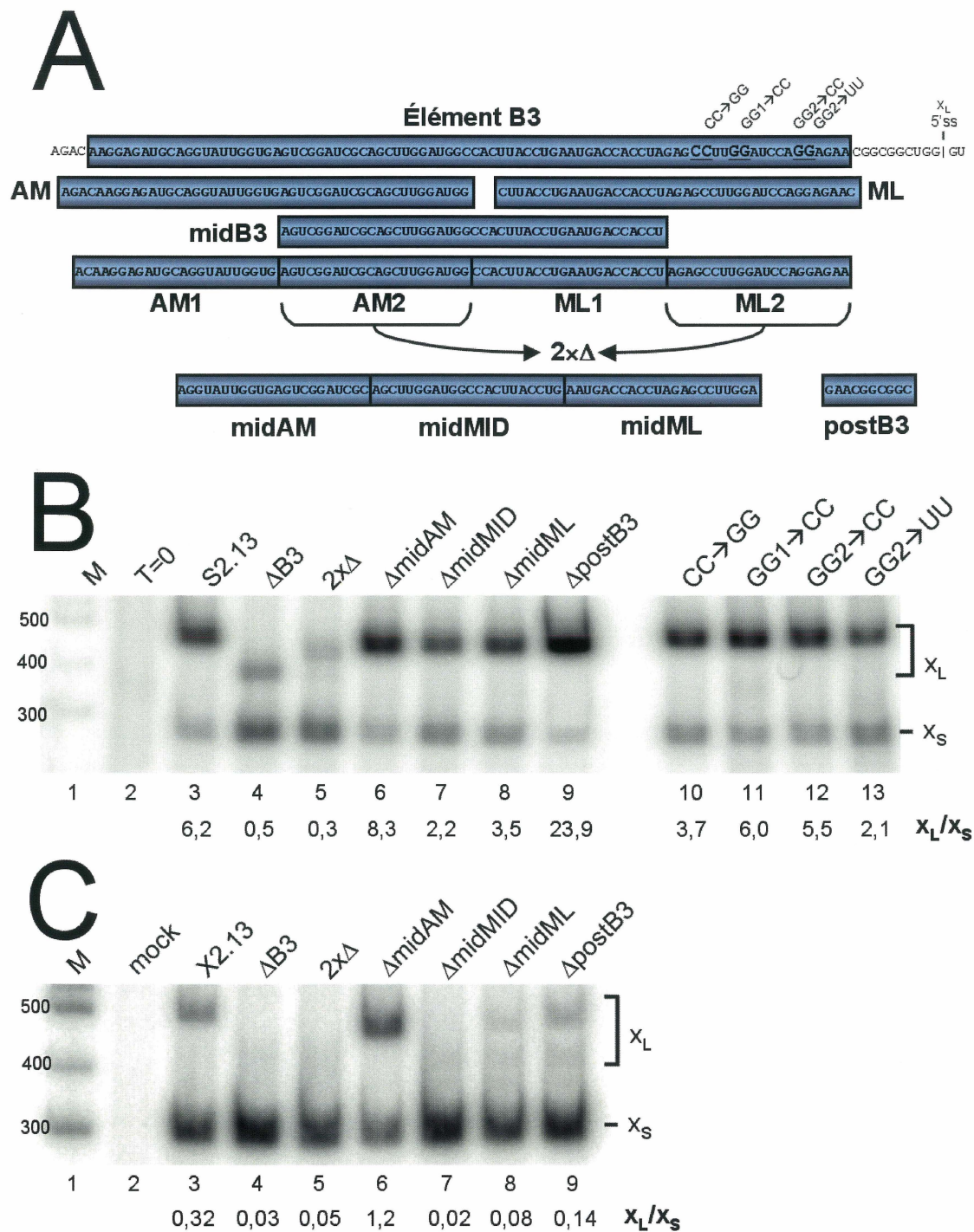


Figure 9, Découverte d'un silencer et d'un élément impliqué dans la liaison de la protéine SRp30c: A Illustration d'une deuxième série de délétions et de mutations ponctuelles dans l'élément B3. Résultats in vitro (B) et in vivo (C) de ces délétions sur un minigène tels qu'obtenus par RT-PCR. «X_L/X_S» réfère au rapport des différents isoformes produits par épissage alternatif dosés par autoradiographie.

ML2 ; figure 9B, piste 8) n'occasionne qu'une faible diminution du ratio x_L/x_S , inférieure en intensité à celle observée par $\Delta ML2$.

La présence d'un silencer dans B3 suggérée plus haut fut confirmée. En effet, $\Delta midAM$ (deuxième moitié de AM1, première de AM2 ; figure 9B, piste 6) engendre, à l'opposé de toutes les mutations réalisées jusqu'à présent dans B3, une augmentation dans le ratio x_L/x_S .

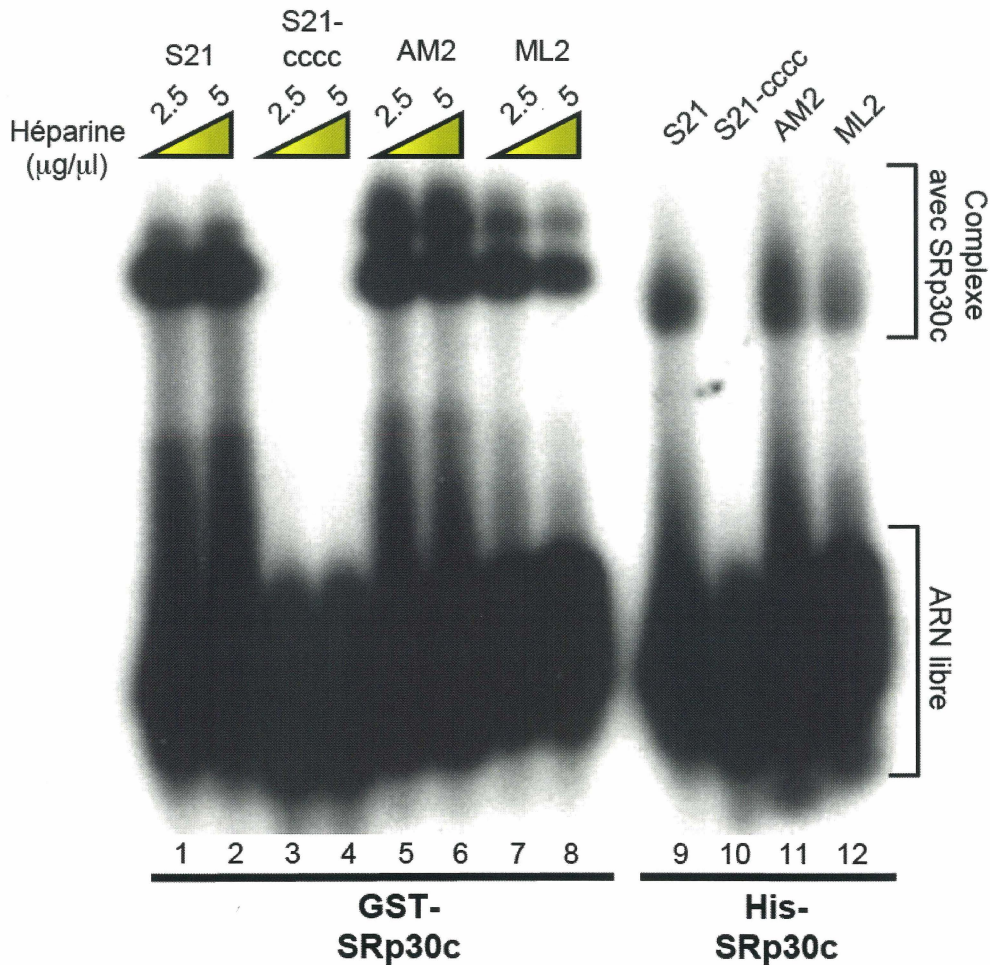
Une autre inquiétude soulevée était que l'effet de la délétion $\Delta ML2$ ne pourrait être qu'un effet indirect dû à sa proximité au site d'épissage 5' de Bcl- x_L . Pour y répondre, j'ai délété une courte région ($\Delta postB3$; figure 9B, piste 9) en aval de ML2. Cette délétion ne provoque pas de diminution du ratio x_L/x_S , mais occasionne plutôt une augmentation de façon marquée *in vitro*, bien que cet effet soit absent *in vivo* (figure 9C, piste 9). L'épissage étant un phénomène co-transcriptionnel, il est possible qu'une mutation puisse affecter l'assemblage du spliceosome *in vitro* (ou l'ARN est d'abord entièrement synthétisé, puis épissé dans une réaction indépendante) alors que ce phénomène serait perdu *in vivo* (plus représentatif de la réalité puisque transcription et épissage peuvent avoir lieu simultanément) ou vice versa. Ainsi, nous nous abstiendrons pour l'instant de qualifier la région postB3 de silencer. Il s'agit d'ailleurs du seul résultat n'ayant pas été reproduit *in vivo*, puisque tous les autres mutants entraînent une variation correspondante dans l'épissage du minigène (figure 9C).

Suite à une analyse de la séquence de AM2 et ML2, j'ai constaté la présence d'une séquence commune à ces deux régions soit : «CUUGGAU». J'ai également découvert dans ML2 la séquence «AGGAG» qui correspond à un site de haute affinité pour SRp30c. En effet, une étude récente effectuée par sélection *in vitro* (SELEX) a identifié la séquence «ASSAS» comme site de liaison de haute affinité pour la protéine SRp30c (où S correspond à une guanosine ou une cytidine) (PARADIS, C. et al., manuscrit soumis). Pour évaluer l'importance relative de ces éléments dans ML2, des mutants de substitution ont été élaborés. Le mutant GG1→CC ciblant l'élément commun avec AM2 n'a donné que peu d'effet sur l'épissage *in vitro* de S2.13 (figure 9B, piste 11). On observe une certaine variation pour le mutant CC→GG (figure 9B, piste 10), mais cet effet n'a pu être reproduit dans d'autres expériences. Le mutant GG2→CC n'a, lui non plus, pas affecté l'épissage alternatif du minigène, mais la substitution guanosine pour cytidine laissant l'élément «ASSAS» intact, ce résultat était à prévoir si SRp30c est effectivement impliqué dans l'activité de cet élément. La substitution GG2→UU détruit l'élément «ASSAS» et conséquemment entraîne une diminution du ratio x_L/x_S , pointant à une possible implication de SRp30c dans l'activité de ML2.

C) Les protéines recombinantes GST-SRp30c et His-SRp30c lient les éléments AM2 et ML2

Suspectant que SRp30c puisse jouer un rôle dans l'activité enhancer de B3 vu l'importance de la séquence «ASSAS» de ML2, j'ai voulu m'assurer de la capacité de SRp30c à lier cette région. Pour ce faire, j'ai effectué un gel de retardement avec de

courts oligos d'ARN correspondant aux régions critiques AM2 et ML2, ainsi qu'un contrôle de liaison de haute affinité, S21 comprenant deux séquences «AGGAC». L'oligo S21-cccc contient des versions mutées de «AGGAC» et ne lie pas SRp30c (PARADIS, C. et al., manuscrit soumis). Tel qu'anticipé, l'oligo ML2 lie les protéines SRp30c



S21 (CTRL+) : ACAA**AGGAC**GGGCAC**AGGACA**
S21-cccc (CTRL-) : ACAA**ACC**ACGGGCAC**ACC**ACA
AM2 : UGAGUCGGAUCGCAGCUUGGAUGGCCAC
ML2 : CCUAGAGCCUUGGAUCC**AGGAGA**ACG

Figure 10, Les protéines recombinantes GST-SRp30c et His-SRp30c lient les éléments AM2 et ML2 : Gel de retardement effectué avec les protéines recombinantes GST-SRp30c et His-SRp30c en présence d'oligos correspondant aux région AM2 et ML2 et des contrôles positifs (S21) et négatifs (S21-cccc) de liaison.

recombinantes, puisqu'on observe un retardement dans la migration de cet oligo en gel natif (figure 10, pistes 7, 8 et 12). L'oligo AM2 lie lui-aussi SRp30c (figure 10, pistes 5, 6 et 11), avec une affinité supérieure à celle de S21 (figure 10, pistes 1, 2 et 9). Ce résultat est surprenant étant donné l'absence d'un élément «ASSAS». Il est possible que la combinaison des séquences «CGGAU», «UGGAU», «UGGCC» et «GCCAC», qui possèdent différents niveaux de similarité à la séquence «ASSAS», soit responsable de cette liaison efficace.

La formation d'un second complexe dans les échantillons incubés en présence de GST-SRp30c est probablement due à une dimérisation de la protéine par l'entremise du domaine GST puisque ce phénomène n'est pas observé avec His-SRp30c.

D) SRp30c endogène lie B3

Ayant démontré la capacité d'oligos correspondant aux éléments AM2 et ML2 à lier des protéines SRp30c recombinantes, j'ai voulu vérifier si SRp30c était capable de lier l'élément B3 complet et déterminer si la délétion des régions AM2 et ML2 affecterait la liaison. Pour ce faire, un transcrit (B3+) correspondant à l'élément B3 suivi du site d'épissage 5' de Bcl-x_L a été synthétisé. Le site d'épissage a été inclus pour s'assurer de la juste représentation des protéines dont la liaison à l'élément B3 pourrait être influencée par des interactions avec le complexe spliceosomal. J'ai tout d'abord voulu évaluer la capacité de ce transcrit à lier la protéine recombinante His-SRp30c dans le contexte d'un extrait nucléaire. Par pontage aux ultra-violets, j'ai observé que His-SRp30c lie

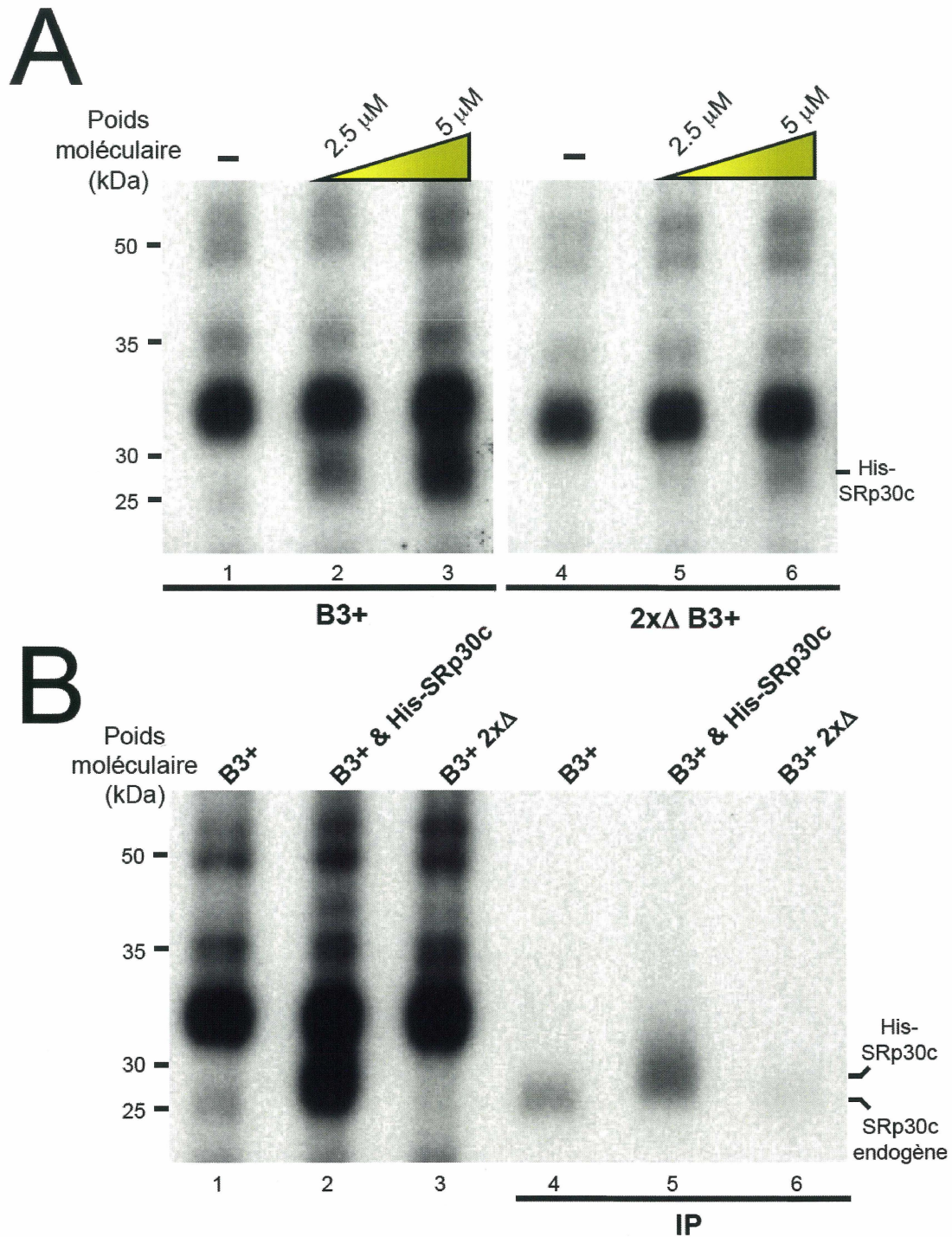


Figure 11, SRp30c endogène lie B3 : **A** Pontage aux ultra-violets d'un transcrit radio-marqué correspondant à l'élément B3 ainsi que le site d'épissage xL avec (B3) et sans (2xΔ) les régions AM2 et ML2 en présence d'une quantité croissante de His-SRp30c. **B** Pontage aux ultraviolets des mêmes transcrits suivi d'une immunoprécipitation avec l'anticorps αSRp30c. Un transcrit B3 a également été incubé avec du His-SRp30c comme contrôle de l'efficacité de l'immunoprécipitation.

effectivement l'élément B3 (figure 11A, pistes 2 et 3), et que cette liaison est fortement perturbée par l'absence des régions AM2 et ML2 ($2 \times \Delta B3+$, figure 11A, pistes 5 et 6).

Pour déterminer si ces observations s'appliquent également à la protéine SRp30c endogène présente dans l'extrait nucléaire de cellules HeLa S3, j'ai ajouté une étape d'immunoprécipitation au protocole de pontage. L'utilisation d'anticorps contre SRp30c me permet de recouvrer les complexes SRp30c/B3+ ce qui nous permet d'observer la présence d'une bande correspondant à SRp30c (figure 11B, piste 4) et migrant légèrement en-deçà de celle correspondant à His-SRp30c (figure 11B, piste 5). Cette différence de poids moléculaire est due au fait que la protéine SRp30c endogène ne contient pas de domaine His, lequel est nécessaire à la purification de la protéine recombinante. On constate également que cette bande est essentiellement inexistante dans le mutant $2 \times \Delta$ (figure 11B, piste 6), ce qui nous permet d'avancer que la liaison de SRp30c à l'élément B3 est médiée principalement par ces deux régions.

E) His-SRp30c favorise l'épissage in vitro au site d'épissage 5' de Bcl-x_L

Ayant montré la capacité de SRp30c à lier B3, nous avons voulu savoir si cette protéine était responsable de l'activité enhancer de cet élément. Pour ce faire, j'ai procédé à l'épissage *in vitro* de S2.13, le minigène de Bcl-x constitué de la deuxième moitié de l'exon 2 ainsi que des 1200 premiers nucléotides de l'intron suivant le site d'épissage 5' de Bcl-x_L. A cette séquence est ajouté le site d'épissage 3' de l'exon 3 flanqué de ses séquences introniques et exoniques (figure 12A). Le tout est transcrit par le biais d'un

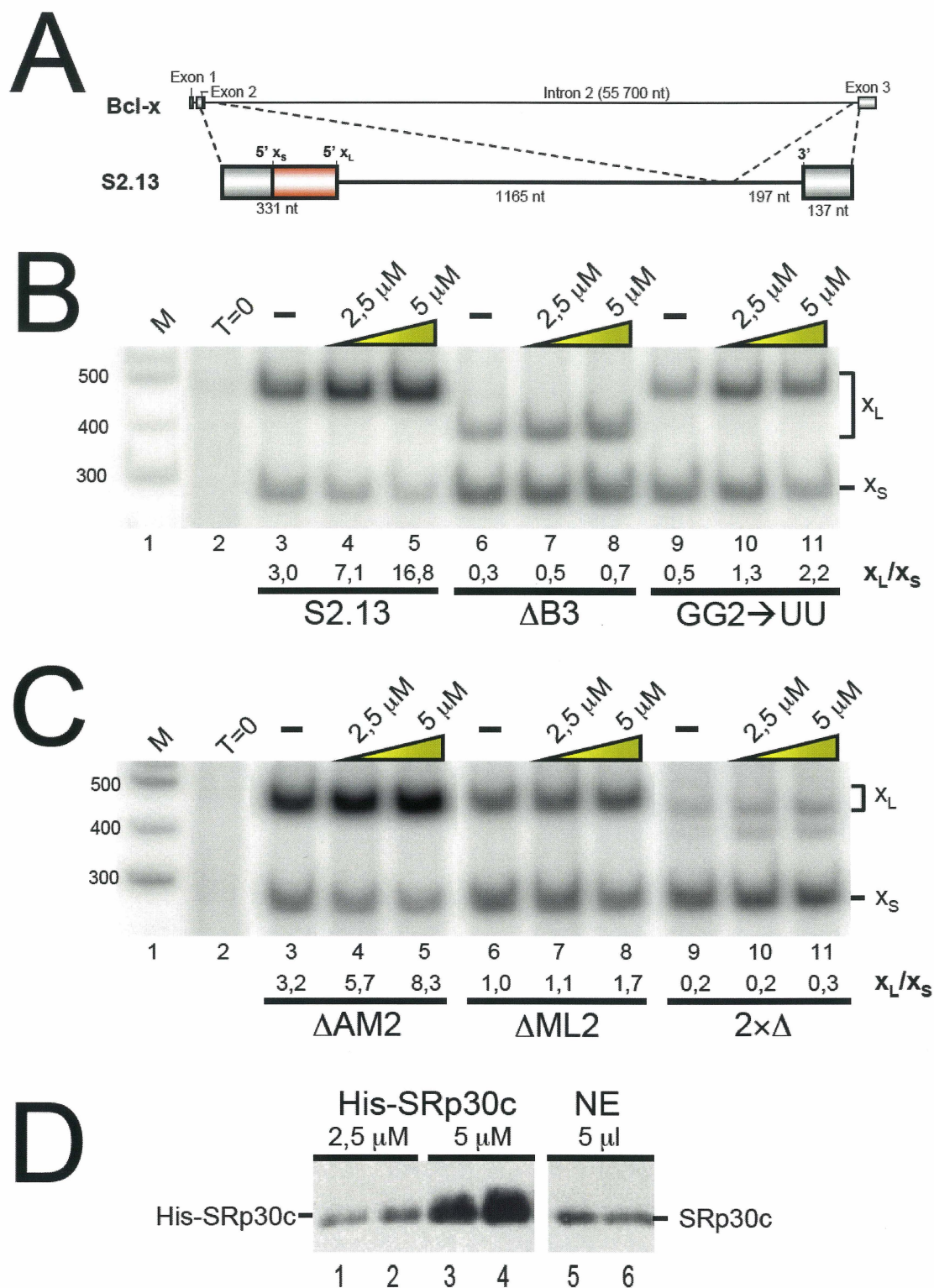


Figure 12, His-SRp30c favorise l'épissage in vitro au site d'épissage 5' de Bcl-xL : A Structure des ARN pré-messagers et du minigène de Bcl-x. B et C Épissage in vitro d'une variété de mutants en présence d'une quantité croissante de His-SRp30c. C Immunobuvardage de type Western réalisé en duplicata avec l'anticorps α SRp30c sur les mêmes quantités de His-SRp30c et d'extrait nucléaire (NE) employées en B et C.

promoteur T3 en amont. Quelques mutants pertinents aux régions AM2 et ML2 ont également été utilisés dans l'expérience d'épissage *in vitro* en présence de concentrations progressivement plus grandes de His-SRp30c. Nous constatons que l'épissage alternatif du minigène S2.13 est fortement affecté par l'ajout de cette protéine recombinante. En effet, le ratio x_L/x_S passe de 3,0 à 16,8, soit une augmentation de 5,6× en présence de 5 μ M de His-SRp30c (figure 12B, pistes 3 à 5). Le mutant $\Delta B3$ est plus faiblement affecté (ratios x_L/x_S de 0,3 à 0,7 ; figure 12B, pistes 6 à 8). Les mutants GG2→CC, $\Delta ML2$ et $2\times\Delta$ sont similairement moins sensibles à l'ajout de His-SRp30c (figure 12B, pistes 9 à 11, figure 12C, pistes 6 à 11). Le mutant $\Delta AM2$ conserve une sensibilité résiduelle avec un ratio x_L/x_S qui augmente de 2,6× en présence de His-SRp30c, alors que ce rapport est réduit à 1,6× chez $\Delta ML2$. Cette dernière observation suggère que l'effet de SRp30c dans l'épissage alternatif de Bcl-x dépend probablement plus de l'élément ML2 que d'AM2.

Afin d'évaluer les quantités de SRp30c recombinant utilisées par rapport au niveau de SRp30c endogène, j'ai effectué un immunobuvardage de type western. On constate que les quantités de His-SRp30c employées pour ces expériences, soit 33.75 pmoles pour 2,5 μ M et 67,5 pmoles pour 5 μ M, correspondent approximativement à 1 et 2 fois la quantité de SRp30c endogène contenu dans 5 μ L d'extrait nucléaire (figure 12D). Les effets sont donc obtenus avec des quantités qui sont physiologiquement pertinentes.

F) L'insertion de l'élément B3 en amont du site d'épissage 5' de Bcl-x_S favorise son utilisation

Afin de vérifier la capacité de l'élément B3 à agir comme enhancer dans un contexte hétérologue, j'ai cloné B3 en amont du site d'épissage 5' de Bcl-x_S du mutant Δ B3. Tel que précédemment décrit, la délétion de B3 diminue fortement le ratio x_L/x_S de 3,5 à 0,6 (figure 13, pistes 3 et 4). De plus, son insertion dans le mutant preX_SB3 stimule

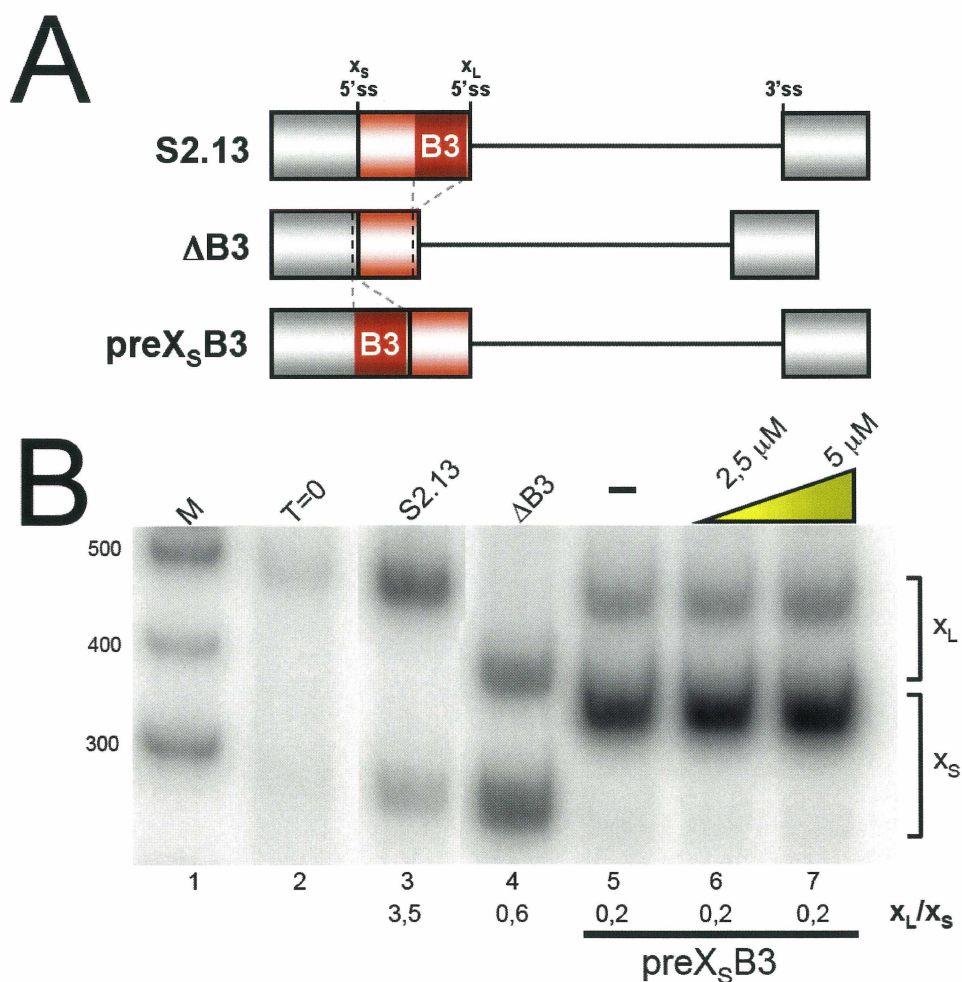


Figure 13, L'insertion de l'élément B3 en amont du site d'épissage 5' de Bcl-x_S favorise son utilisation : **A** Illustration des mutants de délétion et d'insertion utilisés. **B** épissage in vitro réalisé à partir d'un minigène dont l'élément B3 a été déplacé à un autre site en présence d'une quantité croissante de His-SRp30c.

l'utilisation du site d'épissage 5' de x_S , faisant passer le ratio à 0,2 (figure 13, piste 5). Bien que l'ajout de His-SRp30c stimule l'utilisation de x_L dans S2.13 *in vitro*, l'ajout de la même protéine recombinante dans un extrait contenant le mutant preX₅B3 n'influence pas le ratio x_L/x_S (figure 13, pistes 5 à 7). L'explication la plus simple pour cette dernière observation est que bien que B3 soit essentiel pour l'action de SRp30c sur l'épissage alternatif de Bcl-x, cet élément n'est pas suffisant pour transposer cet effet à un autre site qui est déjà presque maximale x_S .

G) La surexpression transitoire de His-SRp30c favorise l'épissage au site 5' de Bcl-x_L

Afin de confirmer *in vivo* le rôle de SRp30c dans l'épissage alternatif de Bcl-x, nous avons effectué la surexpression de SRp30c. L'ADNc de SRp30c fut donc cloné dans un vecteur pcDNA 3.1, puis transfecté transitoirement dans des cellules HeLa S3. L'expérience a été réalisée en triplicata. Un immunobuvardage a d'abord été effectué, mais ne nous a pas permis d'observer de variation notable dans l'expression de SRp30c (figure 14A panneau du bas ; comparer pistes 1-3 et 7-9 aux pistes 4-6 et 10-12). Il est possible que l'absence de surexpression visible par immunobuvardage résulte d'une efficacité de transfection trop faible des cellules. Néanmoins, un effet notable et significatif de la transfection de ce vecteur est observé sur l'épissage alternatif de X2.13 cotransfecté avec SRp30c (figure 14B, comparer pistes 2-4 aux pistes 5-7 ; figure 14C, graphique de gauche ; P-value = 0,003). De plus, cet effet semble dépendre de l'élément B3, puisque son absence dans le minigène $\Delta B3$ neutralise l'effet de SRp30c sur

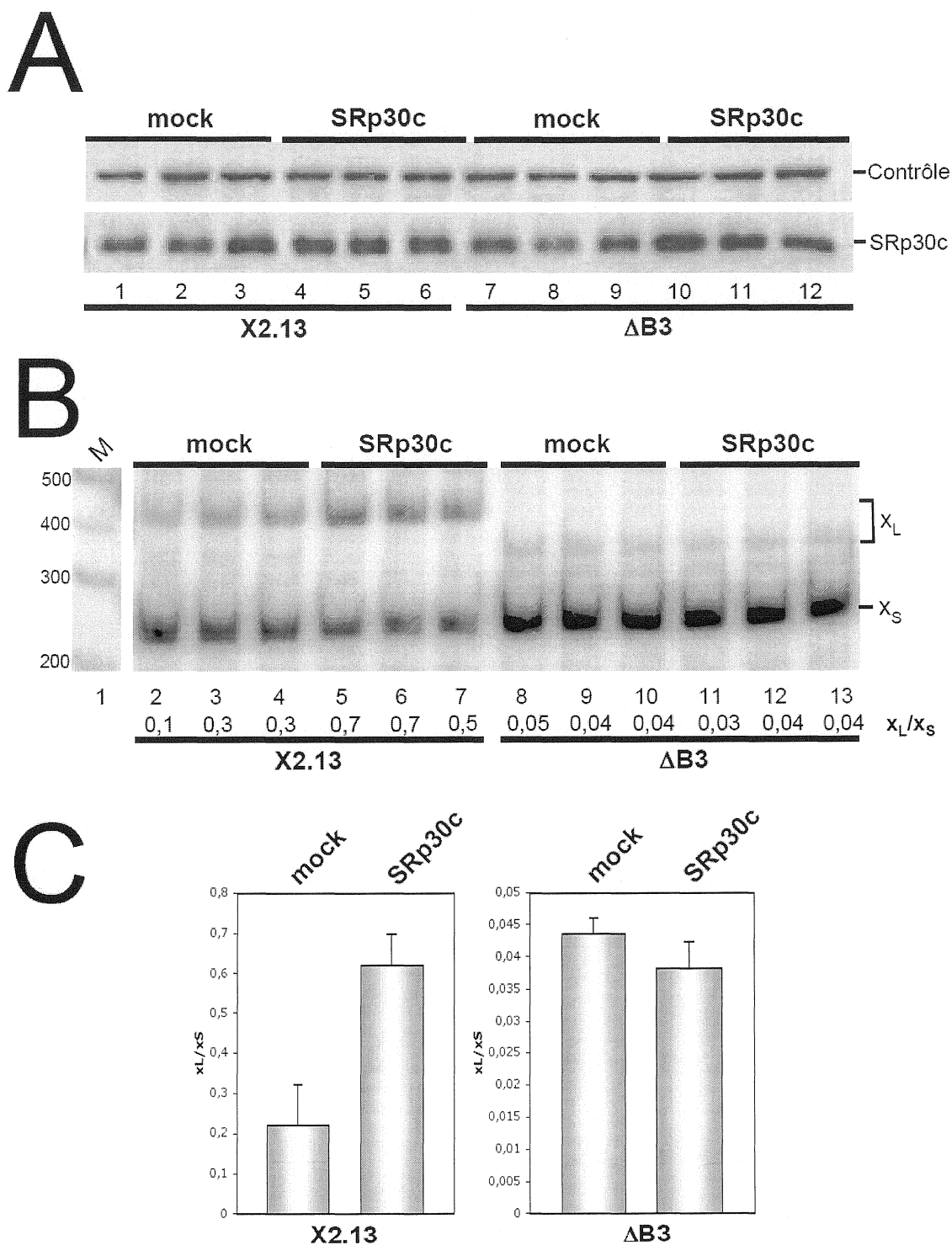


Figure 14, La surexpression transitoire de His-SRp30c favorise l'épissage au site 5' de Bcl-xL : A Immunobuvardage de type Western des cultures cellulaires transfectées transitoirement avec un plasmide de sur-expression de SRp30c. B épissage in vivo de transcrits issus d'un minigène avec et sans l'élément B3. C représentation graphique des résultats compilés en B.

l'épissage alternatif (figure 14B, comparer pistes 8-10 aux pistes 11-13 ; figure 14C, graphique de droite).

H) La surexpression stable de SRp30c renforce le site d'épissage 5' de Bcl-x_L

Croyant que l'absence d'augmentation visible de l'expression de SRp30c par immunobuvardage est due à une trop faible proportion de cellules transfectées, nous avons procédé à la transfection stable du vecteur de surexpression dans les cellules HeLa S3. À titre de comparaison, nous avons également transfecté dans une autre culture le vecteur pcDNA 3.1 vierge. L'expérience a été réalisée en triplicata.

La transfection stable a effectivement permis d'observer une augmentation marquée de l'expression de SRp30c par immunobuvardage (figure 15A panneaux du bas ; comparer pistes 1-3 et 7-9 aux pistes 4-6 et 10-12). Cependant, l'effet précédemment noté de la surexpression de SRp30c sur l'épissage alternatif de Bcl-x n'est pas observé ici. En effet, nous n'observons aucune variation significative du ratio x_L/x_S du minigène X2.13 (figure 15B, comparer pistes 2-4 aux pistes 5-7 ; figure 15C, graphique de gauche) ou de Bcl-x endogène (figure 15B, comparer pistes 8-10 aux pistes 11-13 ; figure 15C, deux premières colonnes du graphique de droite).

Une hypothèse pour tenter d'expliquer la perte d'effet sur l'épissage alternatif de l'expression stable de SRp30c serait que le temps nécessaire à la sélection et la culture de transfectants stables pour le vecteur de surexpression de SRp30c a permis l'établissement

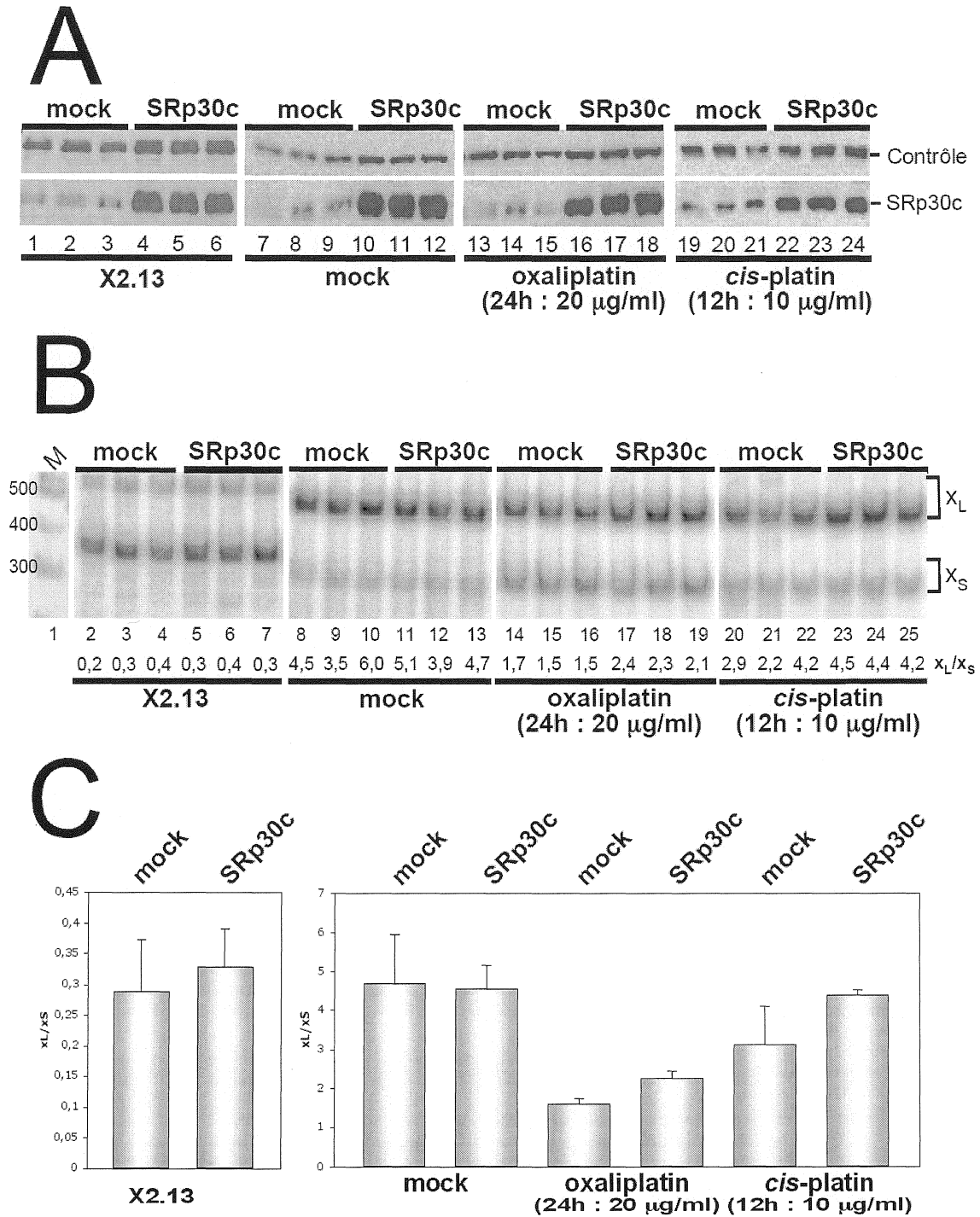


Figure 15, La surexpression stable de SRp30c renforce le site d'épissage 5' de Bcl-xL : A Immunobuvardage de type Western des cultures cellulaires transfectées de façon stable avec un plasmide de surexpression de SRp30c dont certaines ont été traitées 24 heures en présence d'oxaliplatin et 12 heures en présence de *cis*-platin. **B** épissage in vivo de Bcl-x endogène et du transcrit issu d'un minigène. **C** représentation graphique des résultats compilés en B.

d'un mode de contrôle supplémentaire qui rétablit le ratio x_L/x_S normal. Selon cette idée, on peut proposer que ce nouvel équilibre produit par la surexpression de SRp30c puisse diminuer l'influence aux stimuli qui affectent habituellement l'épissage alternatif de Bcl-x des cellules HeLa S3. Pour tester cette hypothèse, j'ai soumis notre transfectant stable à des traitements aux agents pontants *cis*-platine et oxaliplatine, lesquels peuvent diminuer le ratio x_L/x_S dans plusieurs lignées cellulaires dont HeLa S3 (SHKRETA, L. et CHABOT, B., résultats non-publiés). Le traitement à ces agents chimiothérapeutiques n'altère pas l'expression de SRp30c et celle-ci est toujours surexprimée après traitement (figure 15A panneaux du bas ; comparer pistes 13-15 et 19-21 aux pistes 16-18 et 22-24).

Nous confirmons la capacité du *cis*-platine et de l'oxaliplatine à diminuer ce ratio (figure 15B, comparer pistes 8-10 aux pistes 14-16 et 20-22). Cependant, on peut constater que cette diminution du ratio x_L/x_S est moindre dans les cellules surexprimant SRp30c (figure 15B, comparer pistes 14-16 aux pistes 17-19 ainsi que les pistes 20-22 aux pistes 23-25 ; figure 15C, quatre dernières colonnes du graphique de droite ; P-value = 0,003 et 0,07, respectivement). Il est donc apparent que la surexpression de SRp30c a permis de maintenir un ratio x_L/x_S plus près de la normale, suggérant que cette résistance est due à une action directe de SRp30c sur la région B3 de l'ARN pré-messager de Bcl-x.

1) L'interférence à ARN contre SRp30c n'affecte pas l'épissage alternatif de Bcl-x

Ayant observé un effet de la protéine SRp30c sur l'épissage de Bcl-x *in vivo*, nous avons voulu vérifier l'effet d'une réduction de SRp30c par interférence à ARN (RNAi)

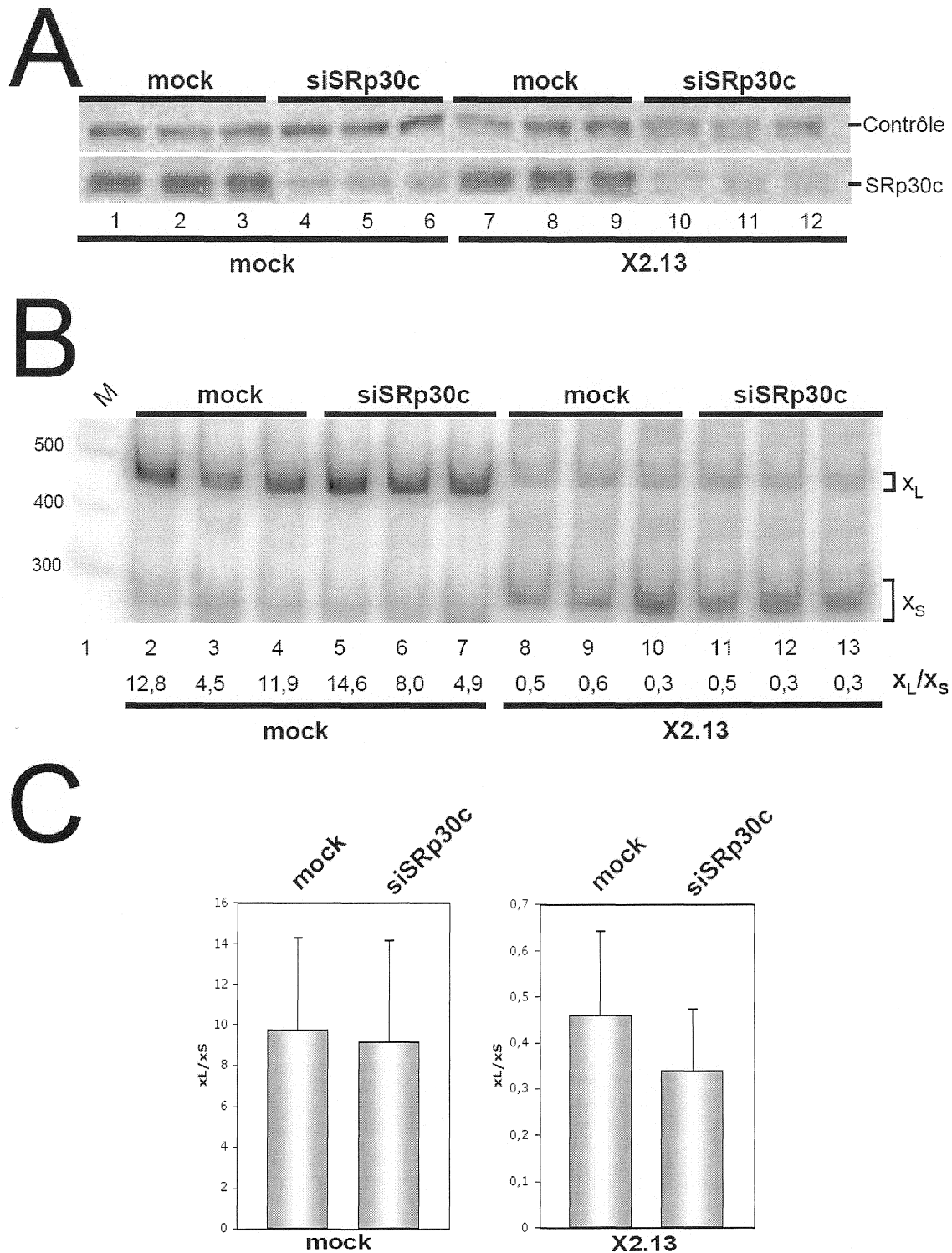


Figure 16, L'interférence à ARN contre SRp30c n'affecte pas l'épissage alternatif de Bcl-x : A Immunobuvardage de type Western des cultures cellulaires traitées avec un siRNA ciblant SRp30c. **B** épissage in vivo de Bcl-x endogène et du transcrit issu d'un minigène. **C** représentation graphique des résultats compilés en B.

sur des cellules HeLa S3. L'expérience a été effectuée en triplicata. Un immunobuvardage de type Western a été réalisé pour s'assurer de l'efficacité de l'interférence à ARN. Nous constatons une diminution appréciable du niveau de SRp30c dans les cellules traitées au siSRp30c (figure 16A panneau du bas ; comparer pistes 1-3 et 7-9 aux pistes 4-6 et 10-12).

L'épissage alternatif de Bcl-x n'est pas affecté par la diminution du taux de SRp30c. Effectivement, aucune variation significative du ratio x_L/x_S n'a été observée autant pour Bcl-x endogène (figure 16B, comparer pistes 2-4 aux pistes 5-7 ; voir aussi la compilation de ces données dans la figure 16C, graphique de gauche) que pour le minigène X2.13 (figure 16B, comparer pistes 8-10 aux pistes 11-13 ; figure 16C, graphique de droite).

Cette absence d'effet sur l'épissage alternatif de Bcl-x pourrait refléter une diminution insuffisante dans l'expression de SRp30c. Alternativement, on ne peut écarter la possibilité qu'un second facteur, ayant une activité enhancer redondante à SRp30c, puisse rescaper la réduction des niveaux de SRp30c.

J) La région midAM contient deux sites d'épissage 5' cryptiques

Dans le but d'identifier les protéines impliquées dans l'activité des éléments identifiés à ce jour, j'ai procédé à une chromatographie d'affinité en utilisant des oligos d'ARN correspondant à des régions de B3. Dans le cas de midAM, la région comprenant

un présumé silencer, notre attention fut retenue par la présence de petites protéines liant spécifiquement cet oligo même après un lavage à 1 M de KCl. En effet, en plus d'un bruit de fond de protéines liant non-spécifiquement les billes d'agarose, l'incubation finale dans le colorant de Laemmli déloge des protéines à environ 40, 30 et 20 kDa (figure 17A,

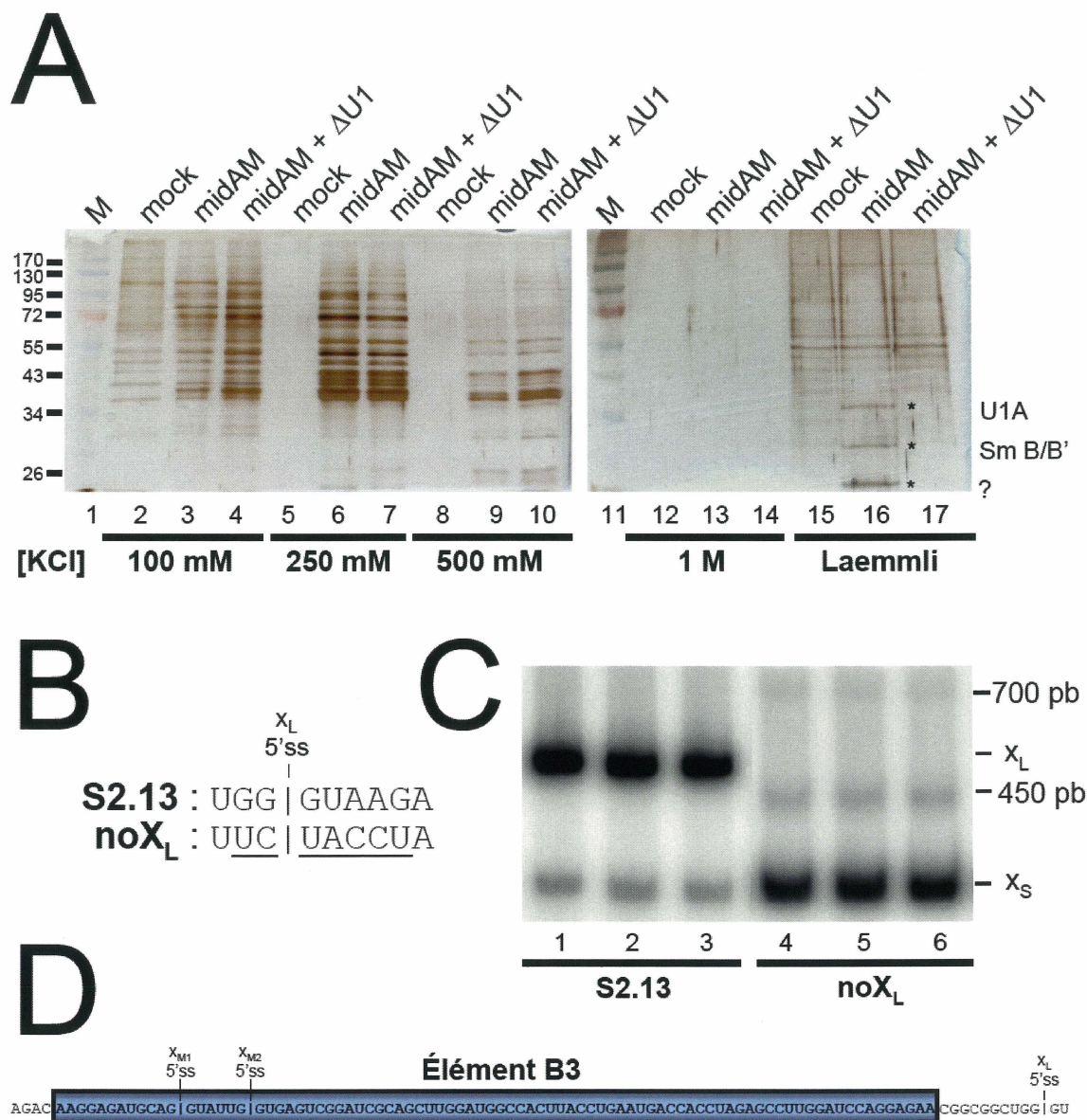


Figure 17, La région midAM contient deux sites d'épissage 5' cryptiques : **A** Chromatographie d'affinité d'ARN pour un oligo correspondant à la région midAM incubé en présence d'extrait nucléaire puis lavé avec différentes concentration de KCl et un lavage final dans une solution de Laemmli. **B** Illustration des mutations induites au site 5' de Bcl-xL. **C** épissage in vitro réalisé en triplicata à partir d'un minigène dont le site 5' de bcl-xL à été inactivé.

comparer pistes 15 et 16). Les deux premières ont été identifiées par spectroscopie de masse comme étant la protéine U1A (7 peptides sur 43, 24 % de couverture) et la protéine Sm B/B' (7 peptides sur 43, 24 % de couverture). La troisième n'a pas donné de candidat significatif, mais on note néanmoins la présence de deux peptides communs à U1A. Ces protéines sont connues comme des composantes du complexe ribonucléoprotéique snRNP U1, responsable de la reconnaissance du site d'épissage 5'. Afin de confirmer que notre oligo midAM est lié par le snRNP U1, j'ai préalablement incubé l'extrait nucléaire avec un oligo 2'-O méthylé complémentaire à l'extrémité 5' du snRNA de U1. Le traitement provoque la disparition des bandes à 40, 30 et 20 kDa, suggérant leur association au snRNP U1 (figure 17A, piste 17).

Les ARN pré-messagers possèdent souvent plusieurs sites d'épissage potentiels dont l'usage n'est observé que lorsque les sites authentiques sont inactivés (on parle alors de sites cryptiques). Afin de vérifier si les sites liés par le snRNP U1 à midAM ont le potentiel d'être utilisés, nous avons procédé à l'inactivation par mutagenèse dirigée du site d'épissage x_L (no x_L) suivi d'un épissage *in vitro* du transcrit ainsi produit. En plus d'inhiber la formation de Bcl- x_L et de favoriser l'usage du site x_S , cette mutation a également entraîné l'apparition de deux nouveaux isoformes (environ 400 et 750 pb, figure 17C, pistes 4 à 6). Le plus grand isoforme n'a pas été séquencé mais résulte probablement de l'usage d'un site cryptique dans l'intron suivant le site d'épissage de x_L . Le séquençage du produit de PCR révèle que l'isoforme de 450 pb résulte de l'usage d'un site d'épissage 5' situé dans la région midAM (site x_{M2} , figure 17D). Une bande de taille similaire avait déjà été observée lors de l'épissage *in vitro* de $2 \times \Delta$ (figure 9B, piste 5 ;

figure 12C, pistes 9 à 11). Le produit dérivé fut alors séquencé et révèle l'épissage à un site 5' cryptique également contenu dans la région midAM et qui chevauche partiellement le site x_{M2} (site x_{M1} , figure 17D). La confirmation de ces résultats *in vivo* serait préférable, mais vu la prédominance de l'isoforme Bcl- x_S , il est fort probable que la détection d'isoformes additionnels serait ardue.

La présence de ces sites cryptiques dans midAM pourrait expliquer l'activité silencer de cet élément. Il est possible que la liaison de snRNP U1 à ces sites interfère avec la reconnaissance du site d'épissage authentique de Bcl- x_L . Des situations similaires de compétition de la liaison de U1 sont répertoriés dans la littérature. C'est notamment le cas pour l'ARN pré-messager de l'élément transposable P de *Drosophila* où le snRNP U1 se lie à un site 5' cryptique de l'exon 3 avec l'aide de la protéine inhibitrice PSI. Le complexe ainsi formé est inefficace pour l'épissage, mais prévient la liaison d'un snRNP U1 additionnel au site d'épissage 5' authentique en aval, menant à la formation d'un isoforme tronqué de la transposase qui agit plutôt comme répresseur de transposition des éléments-P dans les cellules somatiques (SIEBEL *et al.*, 1992).

K) Un site d'épissage 5' de bcl- x_M plus fort ne compétitionne pas avec l'usage du site 5' de Bcl- x_L

Afin de tester l'hypothèse d'une compétition entre les sites cryptiques x_M et le site d'épissage 5' de Bcl- x_L pour la liaison du snRNP U1, j'ai procédé à la mutation par mutagenèse dirigée de l'un des sites d'épissage cryptique, x_{M2} . Les mutations induites

avaient pour fonction d'accroître ou de diminuer la divergence avec le consensus du site d'épissage 5' (figure 18A), résultant en des sites liant plus faiblement (Weak x_M) ou plus fortement (Strong x_M) le snRNP U1.

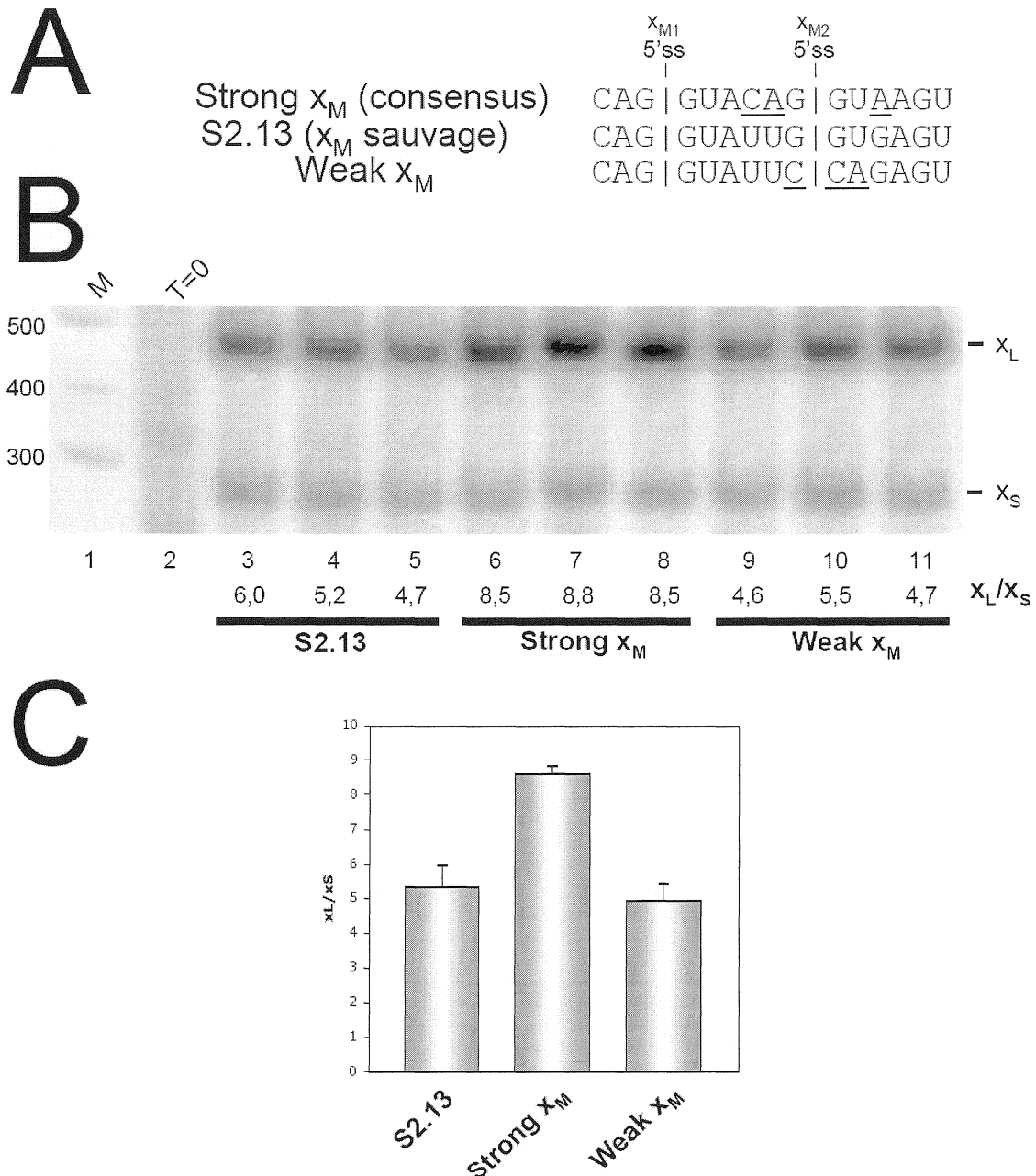


Figure 18, Un site d'épissage 5' de bcl- x_M plus fort ne compétitionne pas avec l'usage du site 5' de Bcl- x_L : A Illustration des sites d'épissage 5' cryptiques x_{M1} et x_{M2} ainsi que des mutations induites au site x_{M2} . B épissage in vitro réalisé en triplicata à partir d'un minigène dont le site 5' cryptique x_{M2} à été muté de façon à le rendre plus proche (Strong x_M) ou plus éloigné (Weak x_M) du consensus pour une site d'épissage 5'. C représentation graphique des résultats compilés en B.

L'affaiblissement du site x_{M2} n'a eu aucun effet sur l'épissage alternatif de Bcl-x (figure 18B comparer les pistes 3-5 aux pistes 9-11 ; figure 18C). De plus, Strong x_M n'entraîne ni l'apparition d'un isoforme Bcl- x_M , ni la diminution de l'usage du site 5' de x_L . En réalité, cette mutation favorise plutôt la formation de Bcl- x_L (figure 18B, comparer les pistes 3-5 aux pistes 6-8 ; figure 18C ; P-value = 0,04), contredisant le modèle de compétition proposé.

Il est difficile de conclure à ce stade sur l'implication des sites cryptiques sur l'activité de midAM. D'une part, l'absence de diminution dans le ratio x_L/x_S suite à l'affaiblissement du site x_{M2} pourrait s'expliquer par une compensation par le site x_{M1} . En ce qui a trait aux résultats obtenus par Strong x_M , il est possible que l'activité silencer de midAM puisse être médiée par un autre facteur et que la mutation vienne détruire le site de liaison ou créer une compétition entre ce facteur et le snRNP U1.

Discussion

Bcl-x est une protéine impliquée dans le processus de mort programmée de la cellule. L'activité du produit de ce gène est régulée au niveau de la maturation de son ARN messenger, plus précisément par le biais de l'épissage alternatif. Bien qu'on ait répertorié quelques événements d'épissage alternatifs supplémentaires, les isoformes principaux sont produits par une compétition entre deux sites d'épissage 5' de l'exon 2. L'usage du site proximal entraîne la formation de l'isoforme long, Bcl-x_L, ayant un caractère anti-apoptotique, alors que la sélection du site distal donne lieu à Bcl-x_S, une protéine pro-apoptotique. Encore peu de choses sont connues sur les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'épissage de cet ARN pré-messenger, mais vu l'importance vitale de Bcl-x, il est à prévoir que la régulation s'effectue par l'entremise d'un ou de plusieurs systèmes complexes composés d'une multitude de facteurs pour permettre une réponse appropriée à toute une variété de signaux.

Une étude précédente avait déjà identifié l'élément B3, un domaine de 86 nucléotides situés 10 nucléotides en amont du site d'épissage 5' de Bcl-x_L (GARNEAU *et al.*, 2005). La même étude avait également démontré une capacité de SRp30c à affecter l'épissage alternatif d'un minigène de Bcl-x *in vitro*. La présente étude nous aura permis d'établir le lien entre ces deux observations.

La dissection de l'élément B3 par mutagenèse aura permis d'identifier deux régions enhancer, AM2 et ML2. Leur présence favorise l'usage du site d'épissage 5' de Bcl-x_L directement en aval.

Des études récentes ont permis d'identifier une multitude de séquences qui, lorsqu'elles sont présentes dans un contexte exonique, favorisent l'épissage. La compilation de ces données a permis de mettre sur pied différents moteurs de recherche d'enhancers exoniques dont «RESCUE-ESE» (FAIRBROTHER *et al.*, 2002), «PESX» (ZHANG et CHASIN, 2004; ZHANG *et al.*, 2005) et «ESR-Search» (GOREN *et al.*, 2006). Si l'on soumet la séquence de l'élément B3 à une analyse par ces logiciels, on trouve un bon nombre de séquences enhancer potentielles couvrant la majorité de l'élément (figure 19B). La présence de ces éléments dans B3 ne signifie pas nécessairement que les régions impliquées sont véritablement des enhancers. Cependant, il est intéressant de noter une superposition marquée de séquences candidates identifiées par les trois logiciels correspondant à la région ML2, suggérant l'importance de cette dernière dans l'épissage alternatif de Bcl-x. De plus, une autre étude a démontré qu'un oligonucléotide, ISIS 22783, s'hybridant en partie avec ML2 aurait provoqué une diminution du ratio x_L/x_S (TAYLOR *et al.*, 1999). Ces données sont donc entièrement compatibles avec notre démonstration de l'existence d'une enhancer dans la région ML2.

A



possèdent un élément commun, «CUUGGAU», et ML2 possède également un motif de séquence «ASSAS» pour lequel la protéine SRp30c possède une haute affinité (PARADIS, C. et al., manuscrit soumis). Une mutation de deux nucléotides dans cet élément diminue d'ailleurs le ratio x_L/x_S , ce qui fait de SRp30c un candidat pour l'activité de ML2.

Par gel de retardement, j'ai notamment montré la capacité de SRp30c à lier un oligonucléotide correspondant à la région ML2 et AM2. De plus, j'ai observé par pontage aux ultra-violets que l'absence de ces deux éléments diminue fortement la capacité de SRp30c recombinant ou endogène à lier l'élément B3. SRp30c montre aussi une capacité à influencer l'épissage alternatif de Bcl-x en favorisant l'usage du site d'épissage 5' de x_L . Cette observation a été notée autant *in vitro*, par l'ajout de SRp30c recombinant, qu'*in vivo*, par la transfection transitoire d'un vecteur de surexpression. Cette activité semble de surcroît être médiée par l'élément B3 puisque son absence neutralise la capacité de SRp30c à affecter l'épissage d'un minigène de Bcl-x. *In vitro*, l'étude a été poussée plus loin et tend suggère que SRp30c agit principalement par l'entremise de l'élément ML2. Cette dernière observation laisse la possibilité de trouver d'autres facteurs médiant l'activité de AM2. Un gel de retardement réalisé en incubant l'oligo AM2 en présence d'extrait nucléaire a montré la formation de complexes supplémentaires à celui observé chez ML2 (données non-montrées).

Nous avons aussi remarqué que bien que la délétion de B3 semble être suffisante pour anéantir l'effet de SRp30c sur l'épissage alternatif de Bcl-x, la transposition de cet

élément à un site d'épissage 5' hétérologue (preX_SB3) favorise l'usage de ce site mais d'une manière qui ne semble pas dépendre de SRp30c. Cette observation nous force à spéculer que la régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x par SRp30c nécessite la présence de séquences additionnelles à B3 qui restent à cerner. Pour ce qui est de l'activité enhancer intrinsèque de B3 chez preX_SB3, il est possible que ce phénomène soit dû à un autre facteur, possiblement médié par AM2 tel que précédemment proposé ou que l'insertion de B3 à ce site ait interféré avec un silencer de Bcl-x_S.

Étrangement, ni la diminution de l'expression de SRp30c par interférence à ARN, ni la transfection stable d'un vecteur de surexpression de cette protéine n'ont montré d'effet sur l'épissage alternatif de Bcl-x *in vivo*. Dans un premier temps, il est possible que SRp30c, présent dans les conditions normales de la cellule ne soit pas impliqué dans l'épissage de Bcl-x. Ainsi, la réduction du taux de SRp30c n'aurait pas eu d'effet sur le ratio x_L/x_S . Nous avons également étudié la possibilité qu'un homologue de SRp30c, en particulier ASF/SF2, puisse compenser pour la perte de SRp30c. La surexpression transitoire d'ASF/ASF2 donne effectivement une augmentation dans le ratio x_L/x_S , mais cet effet est indépendant de la présence de l'élément B3. De plus, la réduction de l'expression combinée de SRp30c et ASF/SF2 par interférence à ARN ne donnent pas plus d'effet sur l'épissage alternatif de Bcl-x (données non-montrées). Pour ce qui est de l'absence d'effet notable de la surexpression stable de SRp30c sur l'épissage alternatif de Bcl-x, nous proposons que la croissance en ces conditions a permis à un ou plusieurs autres mécanismes de contrôle de rétablir une homéostasie dans la production des différents isoformes de Bcl-x. Ce gène étant impliqué dans le processus apoptotique, il ne

serait dès lors pas surprenant que plusieurs mécanismes existent pour palier aux variations d'expression des protéines impliquées dans son épissage en réponse à divers stress environnementaux ou en fonction de l'expression différentielle de ces facteurs dans divers tissus. L'observation que les cellules surexprimant stablement SRp30c sont plus aptes à maintenir un ratio x_L/x_S près de la normale face à certains stimuli apoptotiques (dont l'exposition aux agents chimiothérapeutiques *cis*-platine et oxaliplatine) donne du poids à cette hypothèse.

Cette aptitude de la protéine SRp30c exprimée de façon transitoire à favoriser la formation de l'isoforme anti-apoptotique Bcl- x_L pourrait se révéler pertinente aux phénomènes biologiques comme l'activation des lymphocytes T. En effet, on sait que la stimulation antigénique sensibilise fortement ces cellules à l'apoptose et que leur survie dépend du ratio entre les membres anti et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (STRASSER et PELLEGRINI, 2004). Or, il s'avère que la protéine SRp30c est justement surexprimée chez les lymphocytes T activés (SCREATON *et al.*, 1995).

Pour ce qui est de l'inactivation de cet effet à plus long terme, cette observation pourrait être due à l'introduction d'une force supplémentaire, comme une augmentation de l'usage du site 5' de Bcl- x_S par l'action des protéines hnRNP F/H à l'enhancer B2G (GARNEAU *et al.*, 2005). La modification post-traductionnelle de SRp30c pourrait également être responsable de cet effet. Tel que nous l'avons déjà mentionné, l'état de phosphorylation des protéines SR peut avoir une implication dans l'activité ou la localisation de celles-ci. De plus, une étude récente a découvert que SRp30c pouvait être

une cible de la méthylation via la méthyltransférase PMRT1, bien qu'on ignore encore l'effet de cette modification sur l'activité de SRp30c (COTE, J., communication personnelle).

Enfin, il est intéressant de noter que SRp30c est également sujette à l'activité protéolytique des caspases lors de l'apoptose induite par Fas (THIEDE *et al.*, 2001). Le clivage de cette protéine pourrait ainsi renforcer le processus apoptotique déjà initié en inactivant SRp30c ou en générant des sous-produits ayant une activité potentiellement inhibitrice dans la formation de Bcl-x_L.

L'élément B3 possède également un silencer et deux nouveaux sites d'épissage cryptiques

La caractérisation de l'élément B3 a également permis l'identification d'un silencer, midAM. La liaison du snRNP U1 à un oligo correspondant à midAM a été constatée par chromatographie. L'oligo midAM contient deux séquences montrant une certaine analogie avec la séquence consensus du site d'épissage 5'. L'usage de ces sites cryptiques dans l'épissage a par la suite été observé lorsque le site d'épissage authentique 5' de x_L est inactivé ou lorsque les régions AM2 et ML2 sont délétées. Cette dernière observation suggère qu'AM2 et ML2 vont non seulement favoriser l'utilisation du site d'épissage 5' de x_L plutôt que son homologue apoptotique x_S, mais aussi pour éviter l'usage aberrant de ces sites cryptiques (baptisés x_{M1} et x_{M2}).

Vu leur présence dans un élément silencer, nous avons d'abord cru que les sites cryptiques x_M pouvaient entraîner une compétition pour la liaison du snRNP U1. Cependant, des mutations induites pour diminuer la similarité d'un des sites x_M au consensus pour un site d'épissage 5' n'ont eu aucun effet. De plus, la transformation du site x_{M2} en un site d'épissage 5' plus fort n'entraîne ni son utilisation, ni une diminution de l'usage du site de x_L . En effet, l'isoforme Bcl- x_L semble plutôt favorisé par la présence d'un site x_M plus puissant. La stimulation d'un site authentique par l'entremise d'un site cryptique va à l'encontre du modèle de compétition qu'on avait mis de l'avant jusque là. Ce phénomène n'est cependant pas sans précédent. L'ARN pré-messager du récepteur T3 est également épissé de façon alternative pour produire deux isoformes majeurs selon la rétention ou l'épissage d'un intron alternatif contenant un signal de polyadénylation. Lorsqu'il est retenu, l'ARNm est alors clivé et polyadénylé pour produire l'isoforme TR α 1. Advenant son épissage, un exon terminal supplémentaire est inclus dans l'ARNm pour générer l'isoforme TR α 2. La sélection du site d'épissage 5' de cet intron est favorisée par une séquence intronique directement en aval. Cet élément, connu sous le nom de SE α 2 contient également un pseudo site d'épissage et des mutations dans celui-ci diminuent l'usage du site 5' de TR α 2. Bien que le mécanisme exact reste à découvrir, il a été proposé que la présence de snRNP U1 sur SE α 2 entraîne l'association de protéines supplémentaires (comme les protéines SR ou hnRNP) qui pourraient alors favoriser, à l'instar d'un enhancer, la reconnaissance en amont du site 5' authentique (HASTINGS *et al.*, 2001).

Il ne faut cependant pas rejeter la possibilité que l'activité silencer de midAM soit due à la liaison d'un facteur non-identifié autre que le snRNP U1 et que la mutation x_M Strong ait tout simplement eut comme effet indirect de détruire le site de liaison de celui-ci. Pour ce qui est de l'absence de variation au ratio x_L/x_S du mutant dont le site x_{M2} a été affaibli, ce résultat peut tout aussi bien être interprété comme une indication que ce site d'épissage 5' cryptique n'est pas impliqué dans l'activité du silencer midAM comme il pourrait s'expliquer par une compensation par le site x_{M1} intact. La mutation combinée de ces deux sites devrait permettre de répondre à cette interrogation.

Enfin, il est évident qu'il nous reste beaucoup à découvrir avant de pouvoir comprendre le fonctionnement de l'élément B3. Cependant nous croyons que les résultats rapportés dans la présente étude permettront d'approfondir quelque peu ou du moins de consolider la connaissance des moyens par lesquels la cellule régule l'épissage alternatif de ses ARN pré-messagers. Aussi, nous espérons que l'identification de SRp30c comme modulateur de l'épissage alternatif de Bcl-x, ainsi que les séquences par lesquelles il exerce son activité pourraient un jour mener à de nouvelles avenues thérapeutiques dans la lutte contre le cancer.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord faire part de ma gratitude à mon directeur de recherche, Dr Benoit Chabot, pour l'encadrement et les judicieux conseils prodigués tout au long de mon séjour dans son laboratoire. Je me dois aussi de souligner la participation importante de Mme Johanne Toutant dans la réalisation de la plupart des manipulations liées à la culture cellulaire, notamment les transfections et la production de d'extrait nucléaire. Un merci tout particulier à mes collègues Daniel Garneau, Timothée Revil (pour la découverte de l'élément B3 et la mise au point des techniques employées au cours de ma recherche), Caroline Paradis (pour la synthèse des protéines recombinantes et l'identification du site de liaison de haute affinité pour SRp30c), Jean-François Fisette, Rebeca Martinez-Contreras et Lulzim Shkreta pour leur support continu et leurs conseils. Je souhaite enfin remercier les Drs Antonio Conconi et Marco DiFruscio d'avoir bien voulu accepter de participer à la correction de ce manuscrit.

Références

- Abovich, N., et Rosbash, M.** (1997). *Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals*. Cell 89, 403-412.
- Adams, J.M., et Cory, S.** (1998). *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science 281, 1322-1326.
- Amundson, S.A., Myers, T.G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J.C., et Fornace, A.J., Jr.** (2000). *An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines*. Cancer Research 60, 6101-6110.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., et Martinou, J.C.** (2000). *Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria*. The Biochemical Journal 345 Pt 2, 271-278.
- Baker, B.S., et Wolfner, M.F.** (1988). *A molecular analysis of doublesex, a bifunctional gene that controls both male and female sexual differentiation in Drosophila melanogaster*. Genes & Development 2, 477-489.
- Ban, J., Eckhart, L., Weninger, W., Mildner, M., et Tschachler, E.** (1998). *Identification of a human cDNA encoding a novel Bcl-x isoform*. Biochemical and Biophysical Research Communications 248, 147-152.
- Bashaw, G.J., et Baker, B.S.** (1995). *The msl-2 dosage compensation gene of Drosophila encodes a putative DNA-binding protein whose expression is sex specifically regulated by Sex-lethal*. Development (Cambridge, England) 121, 3245-3258.

Bell, L.R., Maine, E.M., Schedl, P., et Cline, T.W. (1988). *Sex-lethal, a Drosophila sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins.* Cell 55, 1037-1046.

Belote, J.M., McKeown, M., Boggs, R.T., Ohkawa, R., et Sosnowski, B.A. (1989). *Molecular genetics of transformer, a genetic switch controlling sexual differentiation in Drosophila.* Developmental Genetics 10, 143-154.

Bennett, M., Pinol-Roma, S., Staknis, D., Dreyfuss, G., et Reed, R. (1992). *Differential binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins to mRNA precursors prior to spliceosome assembly in vitro.* Molecular and Cellular Biology 12, 3165-3175.

Black, D.L. (2003). *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing.* Annual Review of Biochemistry 72, 291-336.

Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., et Thompson, C.B. (1993). *bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.* Cell 74, 597-608.

Burge, C.B., Padgett, R.A., et Sharp, P.A. (1998). *Evolutionary fates and origins of U12-type introns.* Molecular Cell 2, 773-785.

Caputi, M., et Zahler, A.M. (2002). *SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D.* The EMBO Journal 21, 845-855.

Cavalier-Smith, T. (1991). *Intron phylogeny: a new hypothesis.* Trends in Genetics 7, 145-148.

Chalfant, C.E., Ogretmen, B., Galadari, S., Kroesen, B.J., Pettus, B.J., et Hannun, Y.A. (2001). *FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1.* The Journal of Biological Chemistry 276, 44848-44855.

Chalfant, C.E., Rathman, K., Pinkerman, R.L., Wood, R.E., Obeid, L.M., Ogretmen, B., et Hannun, Y.A. (2002). *De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1.* The Journal of Biological Chemistry 277, 12587-12595.

Chang, B.S., Kelekar, A., Harris, M.H., Harlan, J.E., Fesik, S.W., et Thompson, C.B. (1999). *The BH3 domain of Bcl-x(S) is required for inhibition of the antiapoptotic function of Bcl-x(L).* Molecular and Cellular Biology 19, 6673-6681.

Chen, C.D., Kobayashi, R., et Helfman, D.M. (1999). *Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene.* Genes & Development 13, 593-606.

Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., et Korsmeyer, S.J. (2001). *BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis.* Molecular Cell 8, 705-711.

Chiara, M.D., Palandjian, L., Feld Kramer, R., et Reed, R. (1997). *Evidence that U5 snRNP recognizes the 3' splice site for catalytic step II in mammals.* The EMBO Journal 16, 4746-4759.

- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R., et Dixit, V.M.** (1997). *Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death*. *Science* 275, 1122-1126
- Chou, M.Y., Rooke, N., Turck, C.W., et Black, D.L.** (1999). *hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells*. *Molecular and Cellular Biology* 19, 69-77.
- Clarke, M.F., Apel, I.J., Benedict, M.A., Eipers, P.G., Sumantran, V., Gonzalez-Garcia, M., Doedens, M., Fukunaga, N., Davidson, B., Dick, J.E., et al.** (1995). *A recombinant bcl-x s adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11024-11028.
- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J.L., Bell, J.C., et Duncan, P.I.** (1996). *The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution*. *The EMBO Journal* 15, 265-275.
- Cramer, P., Caceres, J.F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A.F., Baralle, F.E., et Kornblihtt, A.R.** (1999). *Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer*. *Molecular Cell* 4, 251-258.
- Darnell, J.E., Jr.** (1978). *Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eukaryotic cells*. *Science* 202, 1257-1260.

Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R., et Kroemer, G. (1997). *Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents.* *Cancer Research* 57, 62-67.

Del Gatto-Konczak, F., Olive, M., Gesnel, M.C., et Breathnach, R. (1999). *hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer.* *Molecular and Cellular Biology* 19, 251-260.

Denegri, M., Chiodi, I., Corioni, M., Cobianchi, F., Riva, S., et Biamonti, G. (2001). *Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors.* *Molecular Biology of the Cell* 12, 3502-3514.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., et Roeder, R.G. (1983). *Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.* *Nucleic Acids Research* 11, 1475-1489.

Doolittle, W.F. (1978). *Genes in pieces: were they ever together?* *Nature* 272, 581-582.

Ealovega, M.W., McGinnis, P.K., Sumantran, V.N., Clarke, M.F., et Wicha, M.S. (1996). *bcl-xs gene therapy induces apoptosis of human mammary tumors in nude mice.* *Cancer Research* 56, 1965-1969.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., et Martinou, J.C. (2000). *Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane.* *Molecular and Cellular Biology* 20, 929-935.

Estmer Nilsson, C., Petersen-Mahrt, S., Durot, C., Shtrichman, R., Krainer, A.R., Kleinberger, T., et Akusjarvi, G. (2001). *The adenovirus E4-ORF4 splicing enhancer protein interacts with a subset of phosphorylated SR proteins.* The EMBO Journal 20, 864-871.

Fairbrother, W.G., Yeh, R.F., Sharp, P.A., et Burge, C.B. (2002). *Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes.* Science 297, 1007-1013.

Garneau, D., Revil, T., Fisette, J.F., et Chabot, B. (2005). *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x.* The Journal of Biological Chemistry 280, 22641-22650.

Gonzalez-Garcia, M., Garcia, I., Ding, L., O'Shea, S., Boise, L.H., Thompson, C.B., et Nunez, G. (1995). *bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 4304-4308.

Goren, A., Ram, O., Amit, M., Keren, H., Lev-Maor, G., Vig, I., Pupko, T., et Ast, G. (2006). *Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences--The complex definition of enhancers and silencers.* Molecular Cell 22, 769-781.

Graveley, B.R. (2000). *Sorting out the complexity of SR protein functions.* RNA (New York, NY) 6, 1197-1211.

Green, R.E., Lewis, B.P., Hillman, R.T., Blanchette, M., Lareau, L.F., Garnett, A.T., Rio, D.C., et Brenner, S.E. (2003). *Widespread predicted nonsense-mediated mRNA*

decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes.

Bioinformatics (Oxford, England) 19 Suppl 1, i118-121.

Grillot, D.A., Gonzalez-Garcia, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Ohta, S., Seldin, M.F., et Nunez, G. (1997). *Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene.* Journal of Immunology 158, 4750-4757.

Gui, J.F., Lane, W.S., et Fu, X.D. (1994). *A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle.* Nature 369, 678-682.

Han, J.S., Nunez, G., Wicha, M.S., et Clarke, M.F. (1998). *Targeting cancer cell death with a bcl-XS adenovirus.* Springer Seminars in Immunopathology 19, 279-288.

Hastings, M.L., Wilson, C.M., et Munroe, S.H. (2001). *A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA.* RNA (New York, NY 7, 859-874.

Heinrichs, V., Ryner, L.C., et Baker, B.S. (1998). *Regulation of sex-specific selection of fruitless 5' splice sites by transformer and transformer-2.* Molecular and Cellular Biology 18, 450-458.

Hengartner, M.O., et Horvitz, H.R. (1994). *Programmed cell death in Caenorhabditis elegans.* Current Opinion in Genetics & Development 4, 581-586.

Hillman, R.T., Green, R.E., et Brenner, S.E. (2004). *An unappreciated role for RNA surveillance.* Genome Biology 5, R8.

- Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., et Kulozik, A.E.** (2004). *Nonsense-mediated decay approaches the clinic*. *Nature Genetics* 36, 801-808.
- Hossini, A.M., Geilen, C.C., Fecker, L.F., Daniel, P.T., et Eberle, J.** (2006). *A novel Bcl-x splice product, Bcl-xAK, triggers apoptosis in human melanoma cells without BH3 domain*. *Oncogene* 25, 2160-2169.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., et Nunez, G.** (1998). *Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4386-4391.
- Jeong, S.Y., Gaume, B., Lee, Y.J., Hsu, Y.T., Ryu, S.W., Yoon, S.H., et Youle, R.J.** (2004). *Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers*. *The EMBO Journal* 23, 2146-2155.
- Johnson, J.M., Castle, J., Garrett-Engle, P., Kan, Z., Loerch, P.M., Armour, C.D., Santos, R., Schadt, E.E., Stoughton, R., et Shoemaker, D.D.** (2003). *Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays*. *Science* 302, 2141-2144.
- Jurica, M.S., et Moore, M.J.** (2003). *Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins*. *Molecular Cell* 12, 5-14.
- Kandels-Lewis, S., et Seraphin, B.** (1993). *Involvement of U6 snRNA in 5' splice site selection*. *Science* 262, 2035-2039.
- Kanopka, A., Muhlemann, O., et Akusjarvi, G.** (1996). *Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA*. *Nature* 381, 535-538.

Kelekar, A., Chang, B.S., Harlan, J.E., Fesik, S.W., et Thompson, C.B. (1997). *Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL.*

Molecular and Cellular Biology 17, 7040-7046.

Keyes, L.N., Cline, T.W., et Schedl, P. (1992). *The primary sex determination signal of Drosophila acts at the level of transcription.* Cell 68, 933-943.

Kondo, S., Yamamoto, N., Murakami, T., Okumura, M., Mayeda, A., et Imaizumi, K. (2004). *Tra2 beta, SF2/ASF and SRp30c modulate the function of an exonic splicing enhancer in exon 10 of tau pre-mRNA.* Genes to Cells 9, 121-130.

Kornblihtt, A.R. (2005). *Promoter usage and alternative splicing.* Current Opinion in Cell Biology 17, 262-268.

Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J.I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S., et Reed, J.C. (1996). *Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers.* The American Journal of Pathology 148, 1567-1576.

Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., et Cech, T.R. (1982). *Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena.* Cell 31, 147-157.

Levine, A., et Durbin, R. (2001). *A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence.* Nucleic Acids Research 29, 4006-4013.

Lewis, B.P., Green, R.E., et Brenner, S.E. (2003). *Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans.*

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 189-192.

Li, C.Y., Chu, J.Y., Yu, J.K., Huang, X.Q., Liu, X.J., Shi, L., Che, Y.C., et Xie, J.Y. (2004). *Regulation of alternative splicing of Bcl-x by IL-6, GM-CSF and TPA*. Cell research 14, 473-479.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., et Wang, X. (1997). *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell 91, 479-489.

Lindenboim, L., Borner, C., et Stein, R. (2001). *Bcl-x(S) can form homodimers and heterodimers and its apoptotic activity requires localization of Bcl-x(S) to the mitochondria and its BH3 and loop domains*. Cell Death and Differentiation 8, 933-942.

Lindenboim, L., Kringel, S., Braun, T., Borner, C., et Stein, R. (2005). *Bak but not Bax is essential for Bcl-xS-induced apoptosis*. Cell Death and Differentiation 12, 713-723.

Lopez-Hoyos, M., Carrio, R., Merino, J., et Merino, R. (1998). *Regulation of B cell apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL and its role in the development of autoimmune diseases (Review)*. International Journal of Molecular Medicine 1, 475-483.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., et Randall, R.J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. The Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.

- MacCarthy-Morrogh, L., Wood, L., Brimmell, M., Johnson, P.W., et Packham, G.** (2000). *Identification of a novel human BCL-X promoter and exon*. *Oncogene* 19, 5534-5538.
- Madhani, H.D., et Guthrie, C.** (1992). *A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome*. *Cell* 71, 803-817.
- Martin, W., et Koonin, E.V.** (2006). *Introns and the origin of nucleus-cytosol compartmentalization*. *Nature* 440, 41-45.
- Massiello, A., Roesser, J.R., et Chalfant, C.E.** (2006). *SAP155 Binds to ceramide-responsive RNA cis-element 1 and regulates the alternative 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA*. *The FASEB Journal* 20, 1680-1682.
- Massiello, A., Salas, A., Pinkerman, R.L., Roddy, P., Roesser, J.R., et Chalfant, C.E.** (2004). *Identification of two RNA cis-elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA in response to ceramide*. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 15799-15804.
- Merendino, L., Guth, S., Bilbao, D., Martinez, C., et Valcarcel, J.** (1999). *Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG*. *Nature* 402, 838-841.
- Metz, A., Soret, J., Vourc'h, C., Tazi, J., et Jolly, C.** (2004). *A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules*. *Journal of Cell Science* 117, 4551-4558.

Michaud, S., et Reed, R. (1991). *An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway.* Genes & Development 5, 2534-2546.

Min, H., Chan, R.C., et Black, D.L. (1995). *The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre-mRNA splicing event.* Genes & Development 9, 2659-2671.

Moriishi, K., Huang, D.C., Cory, S., et Adams, J.M. (1999). *Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 9683-9688.

Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., et Tsujimoto, Y. (1998). *Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 14681-14686.

Olopade, O.I., Adeyanju, M.O., Safa, A.R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C.B., et Recant, W.M. (1997). *Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases.* The Cancer Journal from Scientific American 3, 230-237.

Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., et Korsmeyer, S.J. (1993). *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.* Cell 74, 609-619.

Pan, G., O'Rourke, K., et Dixit, V.M. (1998). *Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex.* The Journal of Biological Chemistry 273, 5841-5845.

- Park, E., Han, J., Son, G.H., Lee, M.S., Chung, S., Park, S.H., Park, K., Lee, K.H., Choi, S., Seong, J.Y., et al.** (2006). *Cooperative actions of Tra2alpha with 9G8 and SRp30c in the RNA splicing of the gonadotropin-releasing hormone gene transcript*. The Journal of Biological Chemistry 281, 401-409.
- Pecci, A., Viegas, L.R., Baranao, J.L., et Beato, M.** (2001). *Promoter choice influences alternative splicing and determines the balance of isoforms expressed from the mouse bcl-X gene*. The Journal of Biological Chemistry 276, 21062-21069.
- Pellizzoni, L., Charroux, B., Rappsilber, J., Mann, M., et Dreyfuss, G.** (2001). *A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II*. The Journal of Cell Biology 152, 75-85.
- Pellizzoni, L., Yong, J., et Dreyfuss, G.** (2002). *Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly*. Science 298, 1775-1779.
- Petersen-Mahrt, S.K., Estmer, C., Ohrmalm, C., Matthews, D.A., Russell, W.C., et Akusjarvi, G.** (1999). *The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation*. The EMBO Journal 18, 1014-1024.
- Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H.D., Jansen, P.L., et Mertens, P.R.** (2003). *Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection*. The Journal of Biological Chemistry 278, 18241-18248.

Reeve, J.G., Xiong, J., Morgan, J., et Bleehen, N.M. (1996). *Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumour cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resistance*. British Journal of Cancer 73, 1193-1200.

Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A.K., Karle, K., Monani, U.R., et Sendtner, M. (2003). *Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons*. The Journal of Cell Biology 163, 801-812.

Roy, S.W., et Gilbert, W. (2006). *The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress*. Nature Reviews 7, 211-221.

Ruskin, B., Zamore, P.D., et Green, M.R. (1988). *A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly*. Cell 52, 207-219.

Ryner, L.C., et Baker, B.S. (1991). *Regulation of doublesex pre-mRNA processing occurs by 3'-splice site activation*. Genes & Development 5, 2071-2085.

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., et al. (1997). *Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis*. Science 275, 983-986.

Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., et Bertrand, R. (2004). *Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation*. Oncogene 23, 3915-3931.

- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., et Zipursky, S.L.** (2000). *Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity*. *Cell* 101, 671-684.
- Schwerk, C., et Schulze-Osthoff, K.** (2005). *Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing*. *Molecular Cell* 19, 1-13.
- Screaton, G.R., Caceres, J.F., Mayeda, A., Bell, M.V., Plebanski, M., Jackson, D.G., Bell, J.I., et Krainer, A.R.** (1995). *Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors*. *The EMBO Journal* 14, 4336-4349.
- Seol, D.W., et Billiar, T.R.** (1999). *A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis*. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 2072-2076.
- Shaham, S., et Horvitz, H.R.** (1996). *An alternatively spliced C. elegans ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor*. *Cell* 86, 201-208.
- Sharp, P.A.** (1991). *"Five easy pieces"*. *Science* 254, 663.
- Shimizu, S., Narita, M., et Tsujimoto, Y.** (1999). *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. *Nature* 399, 483-487.
- Shin, C., et Manley, J.L.** (2002). *The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells*. *Cell* 111, 407-417.

- Shiraiwa, N., Inohara, N., Okada, S., Yuzaki, M., Shoji, S., et Ohta, S.** (1996). *An additional form of rat Bcl-x, Bcl-xbeta, generated by an unspliced RNA, promotes apoptosis in promyeloid cells.* The Journal of Biological Chemistry 271, 13258-13265.
- Siebel, C.W., Fresco, L.D., et Rio, D.C.** (1992). *The mechanism of somatic inhibition of Drosophila P-element pre-mRNA splicing: multiprotein complexes at an exon pseudo-5' splice site control U1 snRNP binding.* Genes & Development 6, 1386-1401.
- Simard, M.J., et Chabot, B.** (2000). *Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses use of the common 3' splice site.* Molecular and Cellular Biology 20, 7353-7362.
- Simard, M.J., et Chabot, B.** (2002). *SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization.* Molecular and Cellular Biology 22, 4001-4010.
- Smith, C.W.** (2005). *Alternative splicing--when two's a crowd.* Cell 123, 1-3.
- Sontheimer, E.J., et Steitz, J.A.** (1993). *The U5 and U6 small nuclear RNAs as active site components of the spliceosome.* Science 262, 1989-1996.
- Stoss, O., Novoyatleva, T., Gencheva, M., Olbrich, M., Benderska, N., et Stamm, S.** (2004). *p59(fyn)-mediated phosphorylation regulates the activity of the tissue-specific splicing factor rSLM-1.* Molecular and Cellular Neurosciences 27, 8-21.
- Stoss, O., Olbrich, M., Hartmann, A.M., Konig, H., Memmott, J., Andreadis, A., et Stamm, S.** (2001). *The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites.* The Journal of Biological Chemistry 276, 8665-8673.

- Stoss, O., Schwaiger, F.W., Cooper, T.A., et Stamm, S.** (1999). *Alternative splicing determines the intracellular localization of the novel nuclear protein Nop30 and its interaction with the splicing factor SRp30c.* The Journal of Biological Chemistry 274, 10951-10962.
- Strasser, A., et Pellegrini, M.** (2004). *T-lymphocyte death during shutdown of an immune response.* Trends in Immunology 25, 610-615.
- Sumantran, V.N., Lee, D.S., Woods Ignatoski, K.M., Ethier, S.P., et Wicha, M.S.** (2000). *A bcl-xS adenovirus selectively induces apoptosis in transformed cells compared to normal mammary cells.* Neoplasia (New York, NY 2, 251-260.
- Sun, J.S., et Manley, J.L.** (1995). *A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing.* Genes & Development 9, 843-854.
- Suzuki, M., Youle, R.J., et Tjandra, N.** (2000). *Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization.* Cell 103, 645-654.
- Tarn, W.Y., et Steitz, J.A.** (1997). *Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge.* Trends in Biochemical Sciences 22, 132-137.
- Taylor, J.K., Zhang, Q.Q., Wyatt, J.R., et Dean, N.M.** (1999). *Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides.* Nature Biotechnology 17, 1097-1100.
- Teigelkamp, S., Newman, A.J., et Beggs, J.D.** (1995). *Extensive interactions of PRP8 protein with the 5' and 3' splice sites during splicing suggest a role in stabilization of exon alignment by U5 snRNA.* The EMBO Journal 14, 2602-2612.

Thiede, B., Dimmler, C., Siejak, F., et Rudel, T. (2001). *Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis.* The Journal of Biological Chemistry 276, 26044-26050.

Tu, Y., Renner, S., Xu, F., Fleishman, A., Taylor, J., Weisz, J., Vescio, R., Rettig, M., Berenson, J., Krajewski, S., et al. (1998). *BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance.* Cancer Research 58, 256-262.

Wang, H.Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C., et Fu, X.D. (1998). *SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells.* The Journal of Cell Biology 140, 737-750.

Wang, Y., Wang, J., Gao, L., Lafyatis, R., Stamm, S., et Andreadis, A. (2005). *Tau exons 2 and 10, which are misregulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c.SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra2beta1.* The Journal of Biological Chemistry 280, 14230-14239.

Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., et Korsmeyer, S.J. (2000). *tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c.* Genes & Development 14, 2060-2071.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., et Korsmeyer, S.J. (2001). *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.* Science 292, 727-730.

Wu, S., Romfo, C.M., Nilsen, T.W., et Green, M.R. (1999). *Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35*. *Nature* 402, 832-835.

Xiao, S.H., et Manley, J.L. (1998). *Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2*. *The EMBO Journal* 17, 6359-6367.

Xu, Q., Leung, D.Y., et Kisich, K.O. (2003). *Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils*. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 27112-27118.

Yang, X.F., Weber, G.F., et Cantor, H. (1997). *A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells*. *Immunity* 7, 629-639.

Yin, X.M., Oltvai, Z.N., et Korsmeyer, S.J. (1994). *BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax*. *Nature* 369, 321-323.

Young, P.J., DiDonato, C.J., Hu, D., Kothary, R., Androphy, E.J., et Lorson, C.L. (2002). *SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1*. *Human Molecular Genetics* 11, 577-587.

Yuan, Y., Li, D.M., et Sun, H. (1998). *PIR1, a novel phosphatase that exhibits high affinity to RNA . ribonucleoprotein complexes*. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 20347-20353.

- Zamore, P.D., et Green, M.R.** (1989). *Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86, 9243-9247.
- Zhang, X.H., et Chasin, L.A.** (2004). *Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing*. Genes & Development 18, 1241-1250.
- Zhang, X.H., Kangsamaksin, T., Chao, M.S., Banerjee, J.K., et Chasin, L.A.** (2005). *Exon inclusion is dependent on predictable exonic splicing enhancers*. Molecular and Cellular Biology 25, 7323-7332.
- Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R., et Thompson, C.B.** (2001). *BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak*. Genes & Development 15, 1481-1486.
- Zorio, D.A., et Blumenthal, T.** (1999). *Both subunits of U2AF recognize the 3' splice site in Caenorhabditis elegans*. Nature 402, 835-838.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., et Wang, X.** (1997). *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell 90, 405-413.